

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2004年11月18日 (18.11.2004)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2004/099421 A1(51)国際特許分類⁷: C12N 15/85, 15/53, 9/02, 5/06, C12Q 1/02, G01N 33/15, 33/48, 33/483, 33/50

TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP2004/006362

(22)国際出願日: 2004年4月30日 (30.04.2004)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願2003-127629 2003年5月6日 (06.05.2003) JP
特願2003-407564 2003年12月5日 (05.12.2003) JP

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 近江谷 克裕 (OHMIYA, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒5638577 大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立行政法人産業技術総合研究所関西センター内 Osaka (JP). 中島 芳浩 (NAKAJIMA, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒5638577 大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立行政法人産業技術総合研究所関西センター内 Osaka (JP).

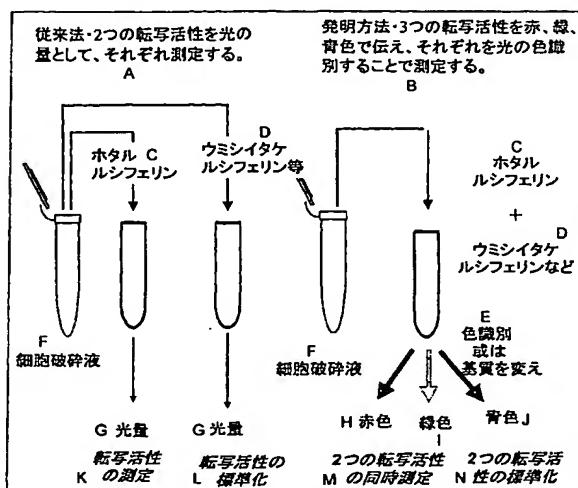
(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND

(74)代理人: 三枝 英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka (JP).

[続葉有]

(54)Title: MULTIPLE GENE TRANSCRIPTION ACTIVITY DETERMINING SYSTEM

(54)発明の名称: マルチ遺伝子転写活性測定システム



- A...CONVENTIONAL METHOD: INDIVIDUALLY DETERMINING TWO TRANSCRIPTION ACTIVITIES AS LIGHT INTENSITY
 B...METHOD OF INVENTION: TRANSMITTING THREE TRANSCRIPTION ACTIVITIES BY RED, GREEN AND BLUE COLORS AND RESPECTIVELY DETERMINING THEM THROUGH LIGHT COLOR IDENTIFICATION
 C...FIREFLY LUCIFERIN
 D...FOR EXAMPLE RENILLA LUCIFERIN
 E...COLOR IDENTIFICATION OR SUBSTRATE CHANGE
 F...CELL LYSATE
 G...LIGHT INTENSITY
 H...RED
 I...GREEN
 J...BLUE
 K...DETERMINATION OF TRANSCRIPTION ACTIVITY
 L...STANDARDIZATION OF TRANSCRIPTION ACTIVITY
 M...SIMULTANEOUS DETERMINATION OF TWO TRANSCRIPTION ACTIVITIES
 N...STANDARDIZATION OF TWO TRANSCRIPTION ACTIVITIES

(57) Abstract: A gene structure comprising any of at least two photoprotein genes capable of emitting different colors with a single luminescent substrate, incorporated in mammiferous cells in a manner realizing stable expression; a system for multiply determining the transcription activity of each of promoters linked to each photoprotein by assessing the amount of photoprotein expressed with the use of mammiferous cells obtained by introducing the above gene structure; etc.

WO 2004/099421 A1

[続葉有]



- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,

KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

同一の発光基質で異なる色を発光する少なくとも2つの発光タンパク遺伝子のいずれかを哺乳類細胞で安定発現可能なように組み込んでなる遺伝子構築物、及び当該遺伝子構築物を導入して得た哺乳類細胞を用い、発光タンパクの発現量を評価することにより、各発光タンパクに結合された各プロモータの転写活性をマルチに測定するシステム等に関する。

明細書

マルチ遺伝子転写活性測定システム

技術分野

本発明は、生体細胞内の遺伝子転写活性を、発光色の異なる発光タンパクを用いてマルチに検出するための遺伝子構築物、該構築物を含む発現ベクター、該構築物または発現ベクターを含む形質転換された哺乳類細胞、該哺乳類細胞を使用する薬物のスクリーニング方法および各プロモータの転写活性をマルチに測定するシステムに関する。

また、本発明は、生体細胞内の遺伝子転写活性を、赤色、橙色、緑色または青色発光タンパクを用いて検出するシステムで用いられる遺伝子およびポリペプチドに関する。

背景技術

生命科学の分野では、細胞内で起きる遺伝子の転写活性を測定することが一般的に行われ、該測定は、細胞に与える外来因子の影響の評価、細胞内情報伝達の伝播、或いは個々のタンパク群の発現解析等に用いられている。これまで、遺伝子転写活性の測定はウェスタンプロット法等で直接測定するか、或は発光タンパクをレポータ遺伝子として間接的に測定する方法があり、特にホタル発光タンパク遺伝子を用いて発光量から転写活性を定量化することが一般化している。また、蛍光蛋白質は細胞内で発現とほぼ同時期に、補因子を必要とせず、蛍光活性を持つ。蛍光蛋白質は、細胞内で蛍光活性を指標として蛋白質の局在等に関するモニター蛋白質として利用されているが、定量化は難しく遺伝子発現レポータ遺伝子としては活用されにくい。

タンパクの遺伝子発現の定量的且つ時間的な動態変化解析を行うことが重要ではあるが、従来のレポータ技術では一つの遺伝子転写活性を解析することが中心である。しかし、最近、ホタル発光タンパク遺伝子に A 転写活性領域を、同時にウミシイタケ発光タンパク遺伝子に B 転写活性領域を挿入、細胞内に 2 つの遺伝子構築物を導入することで 2 つの転写活性を測定するシステム(デュアルアッセイシステム、Promega 社)が市販されている。しかし、この方法は、別々の発光基質をそれぞれ加えることで、転写活性を測定するシステムであり、同時に 2 つの活性が測定できず、また、測定できる転写活性は

2つである。さらに、ホタルルシフェラーゼを使用しているため、pHにより波長が変化し、正確な測定が難しい。

- 細胞内では複数の情報が行き交っており、複数の転写活性を、定量的に測定する技術の構築が必須である。例えば、ヒト体内時計では、24時間のリズムを発信する Per 遺伝子は、Clock、BMAL 遺伝子産物によって制御される。そのため、体内時計を正確に評価するためには複数、少なくとも3種類の転写活性測定が必須である。これまで、個々の遺伝子転写活性の測定がホタル発光タンパクレポータ遺伝子で行われているが、一つの遺伝子転写動態しか観察しておらず、体内時計関連遺伝子発現の相互関係は不明なままである。
- がん化は、がん遺伝子（オンコジーン）の活性化に伴って引き起こされる細胞の異常増殖、或いは腫瘍抑制遺伝子の不活性化に伴って起きる制御から開放された細胞の異常増殖によって進行する。そのため、がん化因子やがん化の細胞内情報伝達を評価するためには、がん遺伝子、腫瘍抑制遺伝子及び細胞分裂マーカー遺伝子の遺伝子転写活性を測定することが望ましい。しかしながら、従来法では一つの遺伝子転写動態しか観察できず、3種類の遺伝子転写活性を評価できないため、がん化における3つの相互関係は充分に理解されていない。

- 遺伝子の転写は、遺伝子産物上流のプロモータ領域といわれる遺伝子配列上に存在する特定の配列に、遺伝子の発現を抑制、或いは促進しようとする物質が結合することによって引き起こされる。E-ボックスや cAMP 結合部位などが、その代表例である。遺伝子転写活性は、プロモータ領域のある長さをレポータ遺伝子上流に挿入して測定する。さらに、そこで有効と考えられた特定配列を合成、レポータ遺伝子上流に挿入し、特定配列の効果を検証する。特定配列の転写制御効果を検証するには、同時にオリジナルのプロモータ領域の転写活性とその効果を標準化できる転写活性を併せて評価する必要がある。しかしながら、従来法では一つの遺伝子転写動態しか観察しておらず、転写活性制御特定配列を充分に評価できない。

発光タンパク類は細胞内の遺伝子転写活性を直接観察する手段として有効であり、遺伝子発現検出モニター蛋白質として利用されている。発光タンパクは多種多彩であるが、その多様性に着目した転写活性測定用レポータ遺伝子はない。発光色の異なる発光タンパク遺伝子をレポータ遺伝子として、異なる転写活性領域を哺乳類細胞に挿入すれば

複数の転写活性を測定できる。鉄道虫由来の赤色発光タンパクは最も発光波長が長く、ホタルやヒカリコメツキ由来発光タンパクに比べて識別が容易で、また、赤色であることから細胞透過性も高い。しかしながら、例えば鉄道虫由来の赤および緑発光タンパクの発現は現在成功しているのは大腸菌であり(US2002/0119542-A1)、ヒトを含む哺乳類細胞
5 でシステムとして成功した例はない。

また、鉄道虫発光タンパク遺伝子の構造を改変することで哺乳類細胞において発現させることが可能にした例もある(WO2003/016839)。

発光タンパクとして、イリオモテボタル由来の発光タンパク質も知られている。

イリオモテボタル由来緑色発光タンパクの発現は現在成功しているのは大腸菌であり
10 (Ohmiya, Y., Sumiya, M., Viviani, VR. and Ohba N.; Comparative aspects of a luciferase molecule from the Japanese luminous beetle *Rhagophthalmus ohba*. *Sci.Rept. Yokosuka City Mus.*..47, 31-38, 2000)、この配列をもとにイリオモテボタル由来橙色発光タンパクが作られ、これも大腸菌での発現には成功した(Viviani, VR., Uchida, A., Suenaga, N., Ryufuku M. and Ohmiya Y.: Thr-226 is a key-residue for bioluminescence spectra
15 determination in beetle luciferases. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 1286-1291, 2001)。さらに、発光タンパクとして渦鞭毛藻やウミシイタケ由来の青色発光タンパクも知られている。

本発明は、細胞内の複数の転写活性を、同時、或いは同時期に測定、定量化できるレポート遺伝子の構築及び最適化、さらに本レポート遺伝子群を用いたマルチ遺伝子転
20 写活性測定システムを開発し、生命科学での細胞機能解析、更には病態の治療、検査及び新薬開発に利用することを目的とする。

また、本発明は、哺乳類細胞・動物において鉄道虫赤色または緑色発光タンパク遺伝子をより安定に転写され、安定に翻訳される遺伝子構築体を作成することを目的とする。

さらに、本発明は、哺乳類細胞・動物においてイリオモテボタル橙色または緑色発光タンパク遺伝子をより安定に転写され、安定に翻訳される遺伝子構築体を作成することを目的とする。
25

これにより、安定に哺乳類細胞・動物での遺伝子転写活性の変化を測定、可視化できる。

図面の簡単な説明

図1は、マルチ遺伝子転写活性の測定概略と従来法との違いを示す。

図2は、哺乳類細胞発現用ベクターの構造とHeLa細胞における発光活性を示す。

図3は、哺乳類培養細胞で生産された鉄道虫由来赤色、緑色発光タンパクの発光ス

ペクトルを示す。

図4は、哺乳類培養細胞で生産された鉄道虫由来赤色、緑色発光タンパクの細胞内
寿命を示す。

図5は、哺乳類細胞で生産された赤、緑色発光タンパクの同時発光スペクトルと色識
別に用いたフィルターの特性(光の透過率)を示す。

10 図6は、赤、緑色発光タンパクの発光反応曲線と発光活性測定時間を示す。

図7は、赤、緑色発光タンパクの存在比と発光活性(図5のフィルターを用いた場合)を
示す。

図8は、マルチ転写活性測定の実際・赤、緑色発光タンパクの光より同時に2つの転
写活性を測定、青色発光タンパクの光によって標準遺伝子の転写活性を測定、2つの転
15 写活性を標準化した結果を示す。

図9は、哺乳類細胞で生産された赤、緑、青色発光タンパクの同時発光スペクトルと色
識別に用いたフィルターの特性(光の透過率)を示す。

図10は、赤、緑色発光タンパクの示す転写活性は連続的に2つの転写活性をモニタ
ーした結果を示す。

20 図11は、一次スクリーニングで多検体を網羅的に解析する例を示す。

図12は、二次スクリーニングで個別事象を評価する例を示す。

図13は、本発明の鉄道虫赤色発光タンパク遺伝子変異体(配列番号7)と鉄道虫野生
型赤色発光タンパク遺伝子(配列番号3)とのDNA配列の相同性を示す。

図14は、最大発光波長630nmの本発明の鉄道虫赤色発光タンパク遺伝子変異体
25 (配列番号7)と最大発光波長622nmのWO2003/016839(配列番号6)の鉄道虫赤色発
光タンパク遺伝子変異体とのDNA配列の相同性を示す。

図15は、野生型、変異体鉄道虫赤色発光タンパクの発光活性の違いを示す。

図16は、哺乳類細胞(マウス由来 NIH3T3 細胞(太線))導入作成した、変異体(配列番号7)と昆虫カイコ細胞(細線)で作成した鉄道虫野生型(配列番号3)の発光スペクトルを示す。

図17は、イリオモテボタル緑色発光タンパク遺伝子の変異型(配列番号10)と野生型(配列番号8)とのDNA配列の相同性を示す。

図18は、イリオモテボタル緑色発光タンパク野生型、変異体及びイリオモテボタル橙色発光タンパク野生型、変異体の発光活性の違いを示す。

図19は、ホタルルシフェリン1つの基質で3つの遺伝子発現を検出する方法の概略を示す。本実施形態の方法は、3つの転写活性を赤、橙、緑色で伝え、それぞれを光の色10識別することで測定する。

図20は、哺乳類細胞で発現したイリオモテボタル緑、橙、鉄道虫赤色発光タンパク混合物の発光スペクトルと設定された分割フィルターの透過曲線である。

図21は、2色発光タンパク((A)緑一赤、(B)緑一橙、(C)橙一赤色発光タンパクの組み合わせ)存在比と発光活性(図22に示したフィルターを用いた場合)を示す。

15 図22は、3色発光タンパク((A)赤色発光タンパクを1として緑一橙色発光タンパク、(B)橙色発光タンパクを1として緑一赤色発光タンパク、(C)緑色発光タンパクを1として橙一赤色発光タンパク)の存在比と発光活性(図20に示したフィルターを用いた場合)を示す。

発明の開示

20 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、発光タンパクを基盤に、発光色の異なる(赤、緑、橙、青色など)或いは発光基質が多様であることに着目して、2つ以上、好ましくは3つ以上、さらに好ましくは4つ以上の発光タンパク(赤、橙、緑、青を含む)由来の光を分別して定量化できるレポータ遺伝子構築物を作成した。各発光タンパク由来の発光量は、各プロモータの転25写活性、すなわち各プロモータが本来連結された遺伝子活性に対応するので、本発明により、2つ以上、好ましくは3つ以上さらに好ましくは4つ以上の遺伝子活性を、好ましくは同時、或いは同時期に測定することができる。また、発光波長が測定条件(pHなど)によって変化しないため、正確な測定が可能である。例えば、本発明の1つの好ましい実施形態では、鉄道虫由来赤、緑色発光タンパク、

イリオモテボタル由来緑、橙色などのレポータ遺伝子構築物を作成、また、ウミシイタケ、ウミボタル、発光性渦鞭毛藻、ヒカリコメツキ、エクオリン等の発光タンパクレポータ遺伝子を同時に用いることで、簡便且つ定量性良く、複数の遺伝子転写活性を測定するシステムを作成した。

- 5 さらに、本発明者は、a)余分な転写因子が結合しないように、cDNA の配列を変えること、b)cDNA の配列を、昆虫のコドンユーセージ(コドンの使用頻度の偏り)を哺乳類用に変え、さらに c)使用上、制限酵素部位が多いことで応用が限定されることからそのcDNA を変えることで、本来哺乳類細胞中ではほとんど或いは全く発現しない発光タンパクにおいて、哺乳類細胞中での転写が容易に行えることを見出した。
- 10 本発明は、以下のポリペプチド、遺伝子、遺伝子構築物、哺乳類細胞、該哺乳類細胞を使用する薬物のスクリーニング方法および各プロモータの転写活性をマルチに測定するシステムを提供するものである。
1. 哺乳類細胞安定発現化された鉄道虫由来赤色及び緑色発光タンパク、並びにイリオモテボタル由来の緑色及び橙色発光タンパクからなる群から選ばれる少なくとも1種の
- 15 発光タンパクをコードする DNA であって、該DNAは、a) 哺乳類細胞の余分な転写因子の結合配列がなく、哺乳類用のコドンユーセージを有することを特徴とするDNA.
2. 哺乳類がヒトであり、配列番号7、10、11及び16からなる群から選ばれる少なくとも1種のヌクレオチド配列を有することを特徴とする項1に記載のDNA。
3. 鉄道虫またはイリオモテボタル由来発光タンパクをコードする DNA の哺乳類における発現を可能にする方法であって、
- 20 a) 余分な転写因子が結合しないように、cDNA の配列を変更する工程
- b) cDNA の配列において、昆虫のコドンユーセージを哺乳類用に変更する工程、さらに任意に
- c) 使用上、制限酵素部位が多いことで応用が限定されることからそのcDNA を変更する
- 25 工程
- を有することを特徴とする方法。
4. 発光タンパクのアミノ酸配列を変更しないことを特徴とする項3に記載の方法。
5. 最大発光波長が630nmである発光タンパクであって、以下のいずれかで表されるポリペプチド：

(i) 配列番号4のアミノ酸配列を有するポリペプチド

(ii) 配列番号4の配列において、1または複数個のアミノ酸が置換、付加、欠失してなるポリペプチド

6. 哺乳類細胞で発現されてなる項5に記載のポリペプチド。

5 7. 最大発光波長が535～635nmであって、発光波長が測定条件に実質的に依存しない光を発光する1または2以上の発光タンパク遺伝子を哺乳類細胞で安定発現可能のように組み込んでなる遺伝子構築物。

8. 最大発光波長が535～635nmであって、発光波長が測定条件に実質的に依存しない光を発光する1または2以上の発光タンパク遺伝子とともに最大発光波長が460～5

10 20nmの1または2以上の発光タンパク遺伝子を組み込んでなる、3以上の発光タンパク遺伝子を哺乳類細胞で安定発現可能である項7に記載の遺伝子構築物。

9. 前記発光タンパク遺伝子が、哺乳類細胞で安定発現化された鉄道虫由来赤色、緑色発光タンパクおよびイリオモテボタル由来の緑色、橙色発光タンパクからなる群から選ばれる少なくとも1種の発光タンパクをコードする遺伝子である項7に記載の遺伝子構築

15 物。

10. 翻訳を効率化するエレメント及び／又はmRNAの安定化エレメントを含む項7に記載の遺伝子構築物。

11. 発光波長が測定条件に実質的に依存しない光を発光する1または2以上の発光タ

20 ンパク遺伝子と、必要に応じて発光波長が測定条件に実質的に依存しない他の発光波

長の光を発光する発光タンパク遺伝子を各々別個のプロモータの制御下に組み込んで

なり、2種以上の発光タンパクによる各発光を分別して測定可能である遺伝子構築物。

12. 項7～11のいずれかに記載の遺伝子構築物を含む発現ベクター。

13. 項7～11のいずれかに記載の遺伝子構築物または項8に記載の発現ベクターで形質転換された哺乳類細胞。

25 14. 発光波長が測定条件に実質的に依存しない相互に分別可能な光を発光する2以上の発光タンパク遺伝子を別個のプロモータの制御下に哺乳類細胞で安定発現可能のように組み込んだ哺乳類細胞。

15. 2以上の前記発光タンパクは、最大発光波長が535～635nmであって、1つの発光基質で発光可能である項13または14に記載の哺乳類細胞。

16. 鉄道虫由来赤色発光タンパク遺伝子を含み、さらに鉄道虫由来緑色発光タンパク遺伝子、イリオモテボタル由来の緑色発光タンパク遺伝子及び橙色発光タンパク遺伝子並びに青色発光タンパク遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも2種を各々別個のプロモータの制御下に含む項15に記載の哺乳類細胞。
- 5 17. 発光波長が測定条件に実質的に依存しない相互に分別可能な光を発光する3以上の発光タンパク遺伝子を別個のプロモータの制御下に哺乳類細胞で安定発現可能のように組み込んでなる項14に記載の哺乳類細胞。
- 10 18. 別個のプロモータの制御下にある3以上の発光タンパク遺伝子を有し、第1の発光タンパク遺伝子が定常発現プロモータの制御下にあり、第2の発光タンパク遺伝子が毒性評価プロモータの制御下にあり、残りの1以上の発光タンパク遺伝子が評価対象のプロモータの制御下にある項14に記載の哺乳類細胞。
- 15 19. 別個のプロモータの制御下にある3以上の発光タンパク遺伝子を有し、第1の発光タンパク遺伝子が定常発現プロモータの制御下にあり、第2の発光タンパク遺伝子が偽プロモータの制御下にあり、残りの1以上の発光タンパク遺伝子が評価対象のプロモータの制御下にある項14に記載の哺乳類細胞。
- 20 20. 別個のプロモータの制御下にある4以上の発光タンパク遺伝子を有し、第1の発光タンパク遺伝子が定常発現プロモータの制御下にあり、第2の発光タンパク遺伝子が毒性評価プロモータの制御下にあり、第3の発光タンパク質が外的因子を受容するタンパクのプロモータであり、残りの1以上の発光タンパク遺伝子が評価対象のプロモータの制御下にある項14に記載の哺乳類細胞。
- 25 21. 別個のプロモータの制御下にある4以上の発光タンパク遺伝子を有し、第1の発光タンパク遺伝子が定常発現プロモータの制御下にあり、第2の発光タンパク遺伝子が偽プロモータの制御下にあり、第3の発光タンパク質が外的因子を受容するタンパクのプロモータであり、残りの1以上の発光タンパク遺伝子が評価対象のプロモータの制御下にある項14に記載の哺乳類細胞。
22. 別個のプロモータの制御下にある2個の前記発光タンパク遺伝子を有し、第1の発光タンパク遺伝子が定常発現プロモータの制御下にあり、第2の発光タンパク遺伝子が毒性評価プロモータの制御下にある項14に記載の哺乳類細胞。

23. 別個のプロモータの制御下にある2個の前記発光タンパク遺伝子を有し、第1の発光タンパク遺伝子が定常発現プロモータの制御下にあり、第2の発光タンパク遺伝子が偽プロモータの制御下にある項14に記載の哺乳類細胞。
24. 項18～21のいずれかに記載の哺乳類細胞の培養液中に薬物候補化合物を存在させて該哺乳類細胞を培養する工程、該候補化合物の存在下及び非存在下で前記発光タンパク量を定量する工程、少なくとも1つの発光タンパクに連結された少なくとも1つの評価対象プロモータに対する該候補化合物の影響を評価する工程を包含する薬物のスクリーニング方法。
25. 項13～23のいずれかの哺乳類細胞の培養環境を変化させて、発光波長が測定条件に依存しない相互に分別可能な光を発光する2以上の発光タンパクの発現量を評価することにより、培養環境変化の前後における各発光タンパクに結合された各プロモータの転写活性をマルチに測定するシステム。
26. 2以上の発光タンパクの発現量を同時に測定する項23に記載のシステム。
27. 3以上の発光タンパクの発現量を測定可能である項23に記載のシステム。

15

以下、本発明を詳細に説明する。

- 本発明の発光タンパクは、2つ以上の発光タンパク由来の発光量を測定し、それらの相対比率を算出することが重要であるので、2つ以上の発光タンパクについて発光波長が測定条件(例えばpH)に実質的に依存しない光を発光することが必要である。
- 20 本明細書において、「発光波長が測定条件に実質的に依存しない」とは、pH、温度、濃度などが変化しても、最大発光波長の変動が3nm以下、好ましくは2nm以下、さらに好ましくは1nm以下、特に好ましくは0.5nm以下である。最大発光波長の変化量がこの範囲内であれば、複数の発光タンパク質の発現量をフィルター等で分離して定量する場合、相互の発光タンパク質の比率がほとんど変化しないため好ましい。
- 25 本明細書において、「相互に分別可能な光を発光する2以上の発光タンパク」とは、例えばフィルター(カラーフィルター、バンドパスフィルターなど)を用いて相互の光の発光量の比率を測定可能であることを意味する。例えば、鉄道虫由来の赤色、緑色発光タンパク、イリオモテボタル由来の橙色、緑色発光タンパクなどは、フィルターを使用することにより、緑色同士を除き、相互の光の発光量の比率を測定可能である。相互の光の発光

量の比率を測定可能であるためには、フィルターの性能や各発光スペクトルのピーク形状にもよるが、最大発光波長が通常 20nm 以上、好ましくは 30nm 以上、より好ましくは 40nm 以上、特に好ましくは 50nm 以上離れているのが好ましい。

本発明で使用される好ましい発光タンパクは、鉄道虫由来の緑～赤(その変異体を含む、最大発光波長:535～635nm、例えば540～630nm)の発光タンパク、ヒカリコメツキムシのオレンジ～緑(その変異体を含む、最大発光波長:530～600nm)の発光タンパク、イリオモテホタルのオレンジ～緑(その変異体を含む、最大発光波長:550～590nm)の発光タンパクなどが挙げられる。例えば鉄道虫の場合、赤色最大発光波長 622nm と緑色最大発光波長 545nm の発光タンパクが知られているが(US2002/0119542-A1)、この2種以外にも540～635nmの間の光を発光する多数の発光タンパクが存在していることを本発明者は確認しており、これらの発光タンパクは、全て使用可能である。例えば、鉄道虫由来の最大発光波長 622nm(昆虫または大腸菌で発現)の赤色発光タンパクは、哺乳類細胞中で発現すると最大発光波長が630nm にシフトすることを本発明者は確認した。この最大発光波長630nm の鉄道虫由来の赤色発光タンパクは、本発明者により初めて発見された。

複数の発光タンパクを用いる場合、発光された各々の光をフィルター等を用いて分別して測定するためには、最大発光波長が 20nm 以上、好ましくは 30nm 以上、より好ましくは 40nm 以上、特に 50nm 以上離れているのが望ましい。この程度の最大発光波長の分離があれば、例えば各最大波長間のフィルターを使用し、フィルターの前後での各発光の透過率を測定して換算することで、各発光の発光量を同時に定量することができる。

例えば、図20の各発光タンパクの最大発光波長は、赤(630nm)、橙(580nm)、緑(550nm)であり、これらは十分に分けることができる。

特に、最大発光波長がある程度離れている複数の発光タンパクを有する鉄道虫、イリオモテボタルなどに由来する発光タンパクを使用する場合、1つの発光基質(例えば鉄道虫、イリオモテボタル、ヒカリコメツキムシ由来の発光タンパクではホタルルシフェリンを使用できる)を使用して、共発現させた複数の発光タンパクに由来する発光量の同時定量が可能であり、各プロモータの発現量の比を正確に測定することができる。また、発光波長が測定条件(例えばpH)に依存しない光を発光する発光タンパクとして、青色に発光するウミシイタケ・ルシフェラーゼ、渦鞭毛藻の各種ルシフェラーゼ(全配列或いはドメ

イン1, ドメイン2, ドメイン3などの発光ドメインを含む;特開2002-335961;Li L., Hong R., Hasting JW., Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1997) 94, 8954)、ウミボタル・ルシフェラーゼをさらに組み合わせて使用することができる。鉄道虫、イリオモテボタル、ヒカリコメツキムシ由来の発光タンパクを使用すると、ホタルルシフェリンを使用できるので、バックグラウンドを
5 低くすることが可能である。また、渦鞭毛藻のルシフェラーゼとルシフェリンの組み合わせについても、バックグラウンドが低く好ましい。

本発明の好ましい実施形態の1つにおいて、鉄道虫、イリオモテボタルの発光タンパクを使うことで1種類のルシフェリンでも少なくとも3つのプロモータの発現量の定量が可能である(例えば鉄道虫の赤色発光タンパクと、イリオモテボタルの橙色及び緑色発光タン
10 パク)(VR. Viviani, A. Uchida, N. Suenaga, M. Ryufuku & Y. Ohmiya: Thr-226 is a key-residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases (2001) *Biochem. Biophys. Res. Communi.* 280, 1286-1291)。また、青色ルシフェラーゼ(ウミシイタケ、渦鞭毛藻またはウミボタルの各ルシフェラーゼ)を合わせて4種以上は可能である。上手なフィルター設定により540-635nm(緑から赤色)、好ましく
15 は540-630nmの中で複数の発現解析は可能であり、さらに基質の違う青色の発光タンパクにより1種類を加えることができる。よって、発光タンパクの同時測定としては、同じルシフェリンで3つ以上、違うルシフェリンも用いて4つ以上の同時定量が可能である。

従来、哺乳類細胞で発現可能な発光タンパクとして、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼが知られていた。しかしながら、ホタルルシフェラーゼは細胞破碎液
20 のpHによって発光する光の色が緑~黄色に変化するため、2種以上の発光タンパクの発現量を比較する場合、正確性に欠ける欠点があった。ウミシイタケ・ルシフェラーゼに由来する青色の発光は、発光波長が測定条件に実質的に依存しない光を発光する点で望ましいが、ホタルルシフェラーゼと組み合わせた測定系では、ホタルルシフェリンを用いた定量とウミシイタケルシフェリンを用いた定量の両方を別個に実施する必要があるため、簡便性、正確性に欠ける欠点があった。

本発明者は、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ以外の発光タンパクとして鉄道虫発光タンパクに着目してこれを哺乳類細胞で発現させることを試みたが、通常の発現系では、鉄道虫発光タンパクを哺乳類細胞で発現させることはできなかった。これが、今まで、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ、

ホタルルシフェラーゼ以外の発光タンパクが哺乳類細胞、特にヒト細胞で発現されてこなかった理由であると考えられる。

本発明者これまでの知見によると、本発明の好ましい1つの実施形態において、鉄道虫発光タンパク、イリオモテボタル発光タンパク、ヒカリコメツキ発光5 タンパクを実用化する上で重要なのは、鉄道虫発光タンパク遺伝子、イリオモテボタル発光タンパク遺伝子、ヒカリコメツキ発光タンパク遺伝子が安定に転写されて、安定に翻訳されることである。本発明の実施例で行った手法では、転写されたmRNA を安定化して翻訳回数を増やせば実用化が可能となることを証明した。つまりこの場合、グロブリンインtronを挿入することでmRNA の寿命を延ばし、10 そして、コザック配列を挿入し翻訳回数を増やすことで、鉄道虫発光タンパク遺伝子の発現を哺乳類細胞で発現させることができた。

本発明の好ましい他の実施形態の更なる手法としては、例えばmRNA のコピー数を増やすことであるので、例えばcDNA の配列を、昆虫のコドンユーセージ（コドンの使用頻度の偏り）を哺乳類用に変えること、さらには、余分な転写因子が15 結合しないように、cDNA の配列を変えること、さらに使用上、制限酵素部位が多いことで応用が限定されることからそのcDNA を変えることが挙げられる。このような手法も、鉄道虫発光タンパク、イリオモテボタル発光タンパクの哺乳類細胞内での発現に有効であった。特にコドンユーセージ（コドンの使用頻度の偏り）を哺乳類用に変えること、さらには、余分な転写因子が結合しないように、20 cDNA の配列を変えることは有効である。

cDNA の配列の変更は、以下の点を1)～4)の順に考慮して行うことができる：

- 1) 発光タンパクのアミノ酸配列はできるだけ変更しないのがよい（好ましくは全く変更しない）；
- 25 2) 次に、余分な転写因子が結合しないように、cDNA の配列を変更する；
3) さらに、cDNA の配列において、昆虫のコドンユーセージを哺乳類用に変更する；
4) 必要に応じてさらに、制限酵素部位をなくすようにcDNA 配列を変更する。

上記は、鉄道虫由来の発光タンパク、イリオモテボタル発光タンパクの発現について記載したが、ヒカリコメツキムシなどの他の生物由来の発光タンパクについても同様に当てはまると考えられる。

本明細書において、「発光タンパク」は、ルシフェラーゼなど、ルシフェリン光化学反応を触媒する発光酵素群を包含し、発光タンパクにはエクオリンのようなものも含まれる。また、ルシフェリンの構造を変化させることにより発光作用を有するような、触媒作用(ルシフェリンを酸化して発光物質に変換する作用)の弱いタンパク質も、発光波長が測定条件(例えばpH)に実質的に依存しない限り本発明の発光タンパクに含まれ得る。

発光タンパクとしては、同一の発光基質で発光する2以上の発光タンパクの組み合わせが望ましい。測定条件により発光波長が実質的に変化せず、且つ、同一の発光基質で発光する好ましい発光タンパクとしては、鉄道虫由来の赤色発光タンパクおよび鉄道虫由来の緑色発光タンパク、或いは540～635nm程度、好ましくは540～630nm程度の範囲の発光波長を有する鉄道虫由来の他の発光タンパク、さらにはイリオモテボタル由来の緑色発光タンパクおよびイリオモテボタル由来の橙色発光タンパクが好ましく例示され、これ以外にも、ヒカリコメツキムシ由来の(530～600nm程度)発光タンパク、が例示される。特に、鉄道虫由来の赤色／緑色発光タンパク、イリオモテボタル由来の橙色／緑色発光タンパクは、発光タンパク量が同一であれば発光強度も同程度であるので、プロモータの転写活性をマルチに定量するのに好都合である。

本発明において、哺乳類としては、ヒト、ウシ、ウマ、ヒツジ、サル、ブタ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌが挙げられ、好ましくはヒトである。

少なくとも2つの発光タンパク遺伝子は、同一の発光基質で異なる色を発光し、細胞内寿命が同程度であるのがよく、この点でも鉄道虫由来の赤色／緑色発光タンパク、イリオモテボタル由来の橙色／緑色発光タンパクは好ましく、特に鉄道虫由来の赤色発光タンパク、イリオモテボタル由来の橙色／緑色発光タンパクは好ましい。

さらに、本発明で使用する発光波長が測定条件(例えばpH)により変化しない少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つの発光タンパク及びこの標準化のための他の発光タンパクの各々異なる発光色は、フィルターで分離可能であることが、各発光色の簡単な装置での定量のために好ましい。例えば鉄道虫由来の赤色／緑色発光タンパクは図5に示されるように、フィルターを用いて容易に分離できるので好ましい。さらに、鉄道虫由来の赤

色／緑色発光タンパクとウミシイタケ由来或いは渦鞭毛藻由来発光タンパク(最大発光波長474～480nm)の組み合わせは、例えば図10に示されるように2つのフィルターを使用することにより容易に分離できるので特に好ましい。さらに、鉄道虫由来赤色、イリオモテボタル緑色／橙色発光タンパク遺伝子は、2つのフィルターを使用して相互に分離

5 することができる(図19)

- 上記のように鉄道虫由来の発光タンパクは、大腸菌では発現することが知られているが、哺乳類細胞、特にヒト細胞での発現系は知られていない。実際、ヒト細胞で鉄道虫由来の発光タンパク(赤、緑)の発現を試みると、図2および実施例1に示すように哺乳類細胞では代表的な発現プロモータであるSV40 や CMV プロモータを単独に用いても発現を誘導することができない。また、イリオモテボタルの場合にも、公知の配列自体では発現レベルが低すぎて実用的ではないが、本発明の変異体は野生型のルシフェラーゼと比較して44倍(緑色)及び57倍(橙色)の発現レベルを有し、十分に実用性を有する。本発明の好ましい実施形態では、発光スペクトルの中からフィルター等を用いて、特定の色の発光タンパクの発現量を評価するため、野生型の発現量では充分に活用できない。
- 10 15 鉄道虫由来の発光タンパク(赤、緑)遺伝子配列は、US2002/0119542-A1 に開示され、US2002/0119542-A1 の赤色発光タンパク遺伝子(誤りを有する)を配列番号5に示す。鉄道虫由来の発光タンパクの正しい塩基配列を配列番号1(緑色発光タンパク遺伝子)と配列番号3(赤色発光タンパク遺伝子)に示し、正しいアミノ酸配列を配列番号2(緑色発光タンパク)および配列番号4(赤色発光タンパク)に示す。
- 20 25 本発明の発光タンパク遺伝子としては、野生型又は変異型発光タンパク遺伝子をそのまま使用することもでき、該発光タンパク遺伝子とストリンジエントな条件下にハイブリダイズし得るDNA、該発光タンパクの1又は複数のアミノ酸が置換、付加、欠失または挿入され、且つ発光タンパク活性を有するポリペプチドをコードするDNAを該発光タンパク遺伝子として使用することが可能である。
- 1つの好ましい実施形態において、本発明者は様々な発現系を検討することにより、発光タンパクの哺乳類細胞での安定発現のためには、翻訳を効率化するエレメント及び／又はmRNAの安定化エレメントを遺伝子構築物に導入することが重要であることを出した。翻訳を効率化するエレメントとしては、kozak 配列(Ko)などが例示され、mRNAの安定化エレメントとしては、 β -globin intron II などが例示される。発光タンパクを哺

乳類細胞中で安定に発現するためには、特に、(β-グロビンイントロン II)ー(コザック配列)ー(赤／緑色発光タンパク)の部分構造が好ましい。また、cDNA の配列を、昆虫のコドンユーセージ(コドンの使用頻度の偏り)を哺乳類用に変えること、さらには、余分な転写因子が結合しないように、cDNA の配列を変えることも発光タンパクの哺乳類細胞での

5 安定発現のために好ましいことを確認した。

一つの好ましい実施形態において、本発明の遺伝子構築物には発光タンパク遺伝子、該遺伝子の上流側にプロモータ、翻訳を効率化するエレメント及び／又はmRNAの安定化エレメントを含み、さらにエンハンサ、IRES、SV40pA、薬剤耐性遺伝子(Neo^rなど)を含み得る。

10 本発明の好ましい遺伝子構築物の例を以下に示す。

(1)(CMV エンハンサ)ー(ニワトリ β アクチンプロモータ)ー(β-グロビンイントロン II)ー(コザック配列)ー(赤、緑色発光タンパク)ー(SV40 ポリ A 配列)

(2) (CMV エンハンサ)ー(ニワトリ β アクチンプロモータ)ー(β-グロビンイントロン II)ー(コザック配列)ー(赤、緑色発光タンパク)ー(IRES)ー(Neo 遺伝子)ー(SV40 ポリ A 配列)

15 本発明の遺伝子構築物は、そのまで哺乳類細胞に導入してもよいが、ベクター(例えばプラスミドやウイルスベクターを含む)に組み込んで哺乳類細胞に導入するのが好ましい。遺伝子構築物に複数の発光タンパクを発現可能に組み込んだ場合には、1つの遺伝子構築物または発現ベクターを哺乳類細胞に導入すればよいが、1つの遺伝子構築物に1つの発光タンパクを組み込んだ場合には、複数の遺伝子構築物または発現ベクタ

20 ーを同時にまたは逐次的に哺乳類細胞に常法に従って導入すればよい。

本発明のシステムにより同時測定が望ましい遺伝子の組み合わせとしては、

・時計遺伝子(Per 遺伝子、Clock 遺伝子、BMAL 遺伝子など)

・癌遺伝子(がん遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、細胞分裂マーカー遺伝子など)

・病気(病態対応遺伝子、生死感受アポトーシス遺伝子、ホルモン遺伝子など)

25 ・定常発現遺伝子(アクチン遺伝子、GAPDH(グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ)遺伝子、サル由来 SV40 ウィルス遺伝子など)

などが例示される。

本発明は、以下ののような応用が可能である。

(1)一次スクリーニング：多検体を網羅的に解析することを想定して、同時に3つ以上の情報を得ることは重要である。当然、複数の組み合わせが考えられる。創薬を考えた場合、その薬の効果はプラスの面を評価するだけでなく、マイナスの毒性も評価する必要がある。

さらに、2つの遺伝子転写レベルの変化は細胞自体の状況を反映することから、細胞の
5 状況を現す一定発現プロモータをコントロールにするのが好ましい。よって、創薬スクリー
ニングでは、以下のような組み合わせが例示される。

なお、表1、表2において、赤色／青色／緑色発光タンパクは単なる例示であり、橙色
発光タンパクを含めた他の発光タンパクあるいは組み合わせを使用できることは言うまで
もない。特に、鉄道虫とイリオモテボタルの赤色／橙色／緑色発光タンパクの組み合
わ

10 せは、ホタルルシフェリンで同時測定が可能であるので特に好ましい。

また、各色の発光タンパクを任意に選択することができる。

表1

創薬スクリーニング

対象プロモータ+緑色発光タンパク	薬剤効果の評価
毒性評価プロモータ(アポトーシス関連等)+青色発光タンパク	薬剤の安全性の評価
定常発現プロモータ+赤色発光タンパク	細胞状態を評価
緑／赤：薬剤効果を標準化、青／赤：安全性を標準化	

この場合、毒性評価と定常発現は薬剤評価対象プロモータのコントロールとなることか

15 ら、一つのベクターで構築することも有用（必須ではない）であり、このベクターを入れた
細胞自体がスクリーニング用の基本細胞となる。

表2

ターゲットプロモータ配列の探索

不特定プロモータ（プロモータライブラリー上の効果のわからない配列群）+緑色発光タンパク	薬剤効果の評価
偽プロモータ配列（ランダムな配列または無意味な配列）+青色発光タンパク	薬剤の安全性の評価
定常発現プロモータ+赤色発光タンパク	細胞状態を評価
緑／赤：プロモータ効果を標準化、青／赤：偽情報の標準化	

この場合、偽プロモータと定常発現プロモータはスクリーニング対象プロモータのコント

20 ロールとなることから、一つのベクターで構築することも有用（必須ではない）であり、この
ベクターを入れた細胞自体がスクリーニング用の基本細胞となる。

赤／橙／緑の組み合わせは表1、表2であらわされるスクリーニングを一つの基質を用いて達成することが可能である。つまり青色発光タンパクを橙色発光タンパクで代用するのである。この場合、一つの基質で測定が行うことが出来、より簡便な方法となる。また、青色発光タンパクを測定するためには細胞を破碎する必要があるが、ホタルルシフェリンは濃度勾配的に生きた細胞中に浸透し発光するので、生きた細胞のまま3つの発光を測定することが出来る。よって、細胞を破碎することなくスクリーニングが出来る特徴がある。

一方、赤／橙／緑／青の組み合わせは、例えば環境ホルモンの評価など、外的な因子も同時に評価できるという利点があり、外的な因子の及ぼす細胞内の複数の遺伝子転写活性の変化を測定できる。例えば、外的な因子を直接捕捉する受容体の発現をモニタ一することが挙げられる。

表3

不特定プロモータ(プロモータライブラリー上の効果のわからない配列群) + 緑色発光タンパク	外的因子の効果の評価
偽プロモータ配列(ランダムな配列または無意味な配列) + 青色発光タンパク	外的因子の安全性の評価
外的因子の受容タンパクのプロモータ配列+橙色発光タンパク	外的因子の受容過程の評価
定常発現プロモータ + 赤色発光タンパク	細胞状態を評価
緑／赤:プロモータ効果を標準化、青／赤:偽情報の標準化 橙／赤:外的因子受容の標準、緑／橙:受容と活性化の評価	

この場合、外的因子を受容するタンパク、それによって直接影響を受けるタンパク、さらには細胞自体の安全性を評価でき、これらを定常発現プロモータのタンパクのコントロールで標準化できることで、外的な因子が細胞に与える情報を正確に評価することができることから一つのベクターで構築することも有用(必須ではない)であり、このベクターを入れた細胞自体がスクリーニング用の基本細胞となる。

一次スクリーニングの例を図11に示す。

(2)二次スクリーニング:絞られた薬剤効果、或いはプロモータ情報の評価を想定、3つ以上の情報を得ることは重要である。創薬などでは、薬剤の効果が複数想定される場合も多い、まずは細胞状態の変化を表す遺伝子、薬剤の一過的な影響(例えば毒性、ショック応答など)を知ること、そして、実際の効果を知ることも重要である。例えば表3、表4に示されるような時計関連薬剤効果の評価システムを例示できる。

表3

時計関連薬剤効果の評価システム

薬剤感知プロモータ(例えば毒性、ショック応答など) + 緑色発光タンパク	薬剤の一過的な効果の評価
日周変動プロモータ(BMAL や Per 遺伝子の配列) + 青色発光タンパク	体内時計の評価
薬剤対応プロモータ + 赤色発光タンパク	薬剤の細胞内効果を評価
青／緑／赤／：薬剤の時間軸評価	

表4

5 時計関連薬剤効果の評価システム

薬剤感知プロモータ(例えば毒性、ショック応答など) + 緑色発光タンパク	薬剤の一過的な効果の評価
日周変動プロモータ(BMAL や Per 遺伝子の配列) + 橙色発光タンパク	体内時計の評価
薬剤対応プロモータ + 赤色発光タンパク	薬剤の細胞内効果を評価
橙／緑／赤／：薬剤の時間軸評価	

特に上記のように、一つの基質で生きた細胞のまま3つの発光を測定することが出来る。

よって、細胞を破碎することなく時計軸に従って薬剤の効果を評価出来る特徴がある。

また、同じ細胞に対して、一連の操作を行うことで、複数の操作の組み合わせ(履歴)に対する薬剤の効果を評価出来る。

10

二次スクリーニングの例を図12に示す。

上記のように、2種以上、特に3種以上、あるいは4種以上のプロモータの発現量を、好ましくは同時に評価することで、1つのプロモータに対する作用を評価する場合に、活性、毒性等の標準化、或いは偽情報の標準化を行うことができる。

15 さらに、哺乳類において複数の遺伝子の発現が複雑に関連した現象を解明する場合にも、本発明のシステムは極めて有用である。

本発明の特に好ましい実施形態では、鉄道虫由来の赤色、緑色発光タンパク遺伝子、イリオモテボタル由来の緑色、橙色発光タンパク遺伝子及び青色発光タンパク遺伝子を用いて3つまたは4つの遺伝子転写活性を同時定量化するための方法・システムを提供

20 する。本システムを使用することで、細胞内の複数の転写活性を同時に測定することができる。これらは病態の治療、検査及び新薬開発に利用が可能である。

この際、赤、緑、橙、青色に特化したフィルターを用いて、発光活性を測定することで、色識別が行われ、細胞内で行われる複数の転写を同時に測定でき、従来、1つの転写活性の変化情報では判断が容易でなかった細胞内の変化について、同時に多くの情報を引き出すことができ、各種病態の治療及び新薬開発への利用も可能となる。

- 5 本発明において、別個のプロモータの制御下にある2個の発光タンパク遺伝子を有し、
 - i) 第1の発光タンパク遺伝子が定常発現プロモータの制御下にあり、第2の発光タンパク遺伝子が毒性評価プロモータの制御下にある哺乳類細胞；あるいは、
 - ii) 第1の発光タンパク遺伝子が定常発現プロモータの制御下にあり、第2の発光タンパク遺伝子が偽プロモータの制御下にある請求項14に記載の哺乳類細胞
- 10 は、これら哺乳類細胞に、1以上の発光タンパク遺伝子を評価対象のプロモータの制御下に組み込んだ遺伝子構築物をさらに導入して、薬物スクリーニング用の哺乳類細胞を製造するための中間体細胞として有用である。

発明を実施するための最良の形態

- 15 以下、本発明を実施例に従いより詳細に説明するが、本発明が実施例に限定されることは言うまでもない。

実施例1

鉄道虫由来緑、赤色発光タンパク遺伝子(配列番号1, 3)は大腸菌では発現するが、哺乳類細胞では代表的な発現プロモータであるSV40やCMVを単独に用いても発現を誘導することができない。そこで遺伝子発現を安定化させるコザック(kozak)配列、 β -グロビンインtron II(β -globin intron II)を挿入、さらにニワトリ β アクチンプロモータやCMV エンハンサの4つの因子を選択した構築物を赤、緑色発光タンパクに連結した遺伝子構造体を作成し、酵素活性を測定した(図2)。この際、SV40 プロモータ、CMV プロモータ、およびCAG プロモータ下流に発光タンパク遺伝子を挿入したものと比較とした。それぞれの遺伝子を培養纖維芽細胞 NIH3T3 細胞にリポフェクタミンを用いて導入、24時間後の細胞内の発光活性を測定した(図2)。発光活性の測定には基質として発光基質混合溶液(東洋ビーネット社製)を、発光測定装置はアトー(株)製 AB-2000 を用いた。サンプルは細胞抽出液 50 μ L にピッカジーン 50 μ L を加えた。その結果、(CMV エンハンサ)–(ニワトリ β アクチンプロモータ)–(β -グロビンインtron II)–(コザック配列)–

(赤、緑色発光タンパク) — (SV40 ポリ A 配列)を挿入したもので、最も高い活性が、下流に(SV40 ポリ A 配列)の変わりに(IRES) — (Neo 遺伝子) — (SV40 ポリ A 配列)を挿入したもので次いで高い活性が得られた。しかしながら、SV40 プロモータ、CMV プロモータ単独では、ほとんど活性がなかった。但し(CMV エンハンサ) — (ニワトリ β アクチンプロモータ)
5 — (β -グロビンインtron II) — (コザック配列) — (赤、緑色発光タンパク) — (IRES) — (Neo 遺伝子) — (SV40 ポリ A 配列)の活性に対して、(CMV エンハンサ) — (ニワトリ β アクチ
10 ナンプロモータ) — (β -グロビンインtron II) — (赤、緑色発光タンパク) — (IRES) — (Neo 遺伝子) — (SV40 ポリ A 配列)は約500分の1に、(CMV プロモータ) — (β -グロビン
15 イントロン II) — (コザック配列) — (赤、緑色発光タンパク) — (SV40 ポリ A 配列)では約1
0分の1の活性となった。このことから、鉄道虫由来、緑色発光タンパク遺伝子を哺乳類細胞内で安定に発現、遺伝子転写活性を測定するためには、直接的に転写活性には影響を与えない領域である酵素遺伝子上流に(β -グロビンインtron II) — (コザック配列)を挿入することが好ましいことが明らかとなった。これは kozak 配列による翻訳の高効率化及び β -globin intron II による mRNA の安定化が大きいと考えられ、発光タンパク遺
15 伝子を含む転写産物の効率化・安定化が実用化の鍵であることが明らかとなった。

実施例2

哺乳類細胞内で発現した鉄道虫由来、緑色発光タンパク遺伝子の発光スペクトル解析を行った。最も高い活性を示した(CMV エンハンサ) — (ニワトリ β アクチンプロモータ)
20 — (β -グロビンインtron II) — (コザック配列) — (赤、緑色発光タンパク) — (SV40 ポリ A 配列)遺伝子を導入した細胞の抽出液 $15\mu L$ にピッカジーン $15\mu L$ を加え、アトー(株)製微弱発光スペクトル測定装置を用いて発光スペクトルを測定した。図3は、それぞれを単独に発現させた場合の発光スペクトルであり、赤色発光タンパクでは最大発光波長 $630nm$ のスペクトルが、緑色では最大発光波長 $550nm$ のスペクトルが各々得られた。本ス
25 ペクトルはpH や周りの溶液の影響を受けず、常に同じスペクトルを示した。

実施例3

哺乳類細胞内で発現した鉄道虫由来赤色、緑色発光タンパク遺伝子の細胞内寿命を評価した。(CMV エンハンサ) — (ニワトリ β アクチンプロモータ) — (β -グロビンインtron

- II) — (コザック配列) — (赤、緑色発光タンパク) — (IRES) — (Neo 遺伝子) — (SV40 ポリ A 配列) 遺伝子を導入した細胞を用いた。細胞内で発現した発光タンパクをリポフェクション法により培養纖維芽細胞 NIH3T3 に導入した細胞を用いた。遺伝子導入 48 時間後、
10 μ M の蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミドを含む培養液に置換し、30分間培養後、
5 経時的に細胞内の発光活性を測定した。発光活性の測定は実施例1と同様の方法で行
った。その結果、赤色、緑色発光タンパク共に、同じような時間経過で活性減少が認めら
れ、細胞内でのそれぞれの酵素の半減期は約3.5時間であった(図4)。

実施例4

- 10 鉄道虫由来赤色、緑色発光タンパク遺伝子((CMV エンハンサ) — (ニワトリ β アクチンブ
ロモータ) — (β -グロビンイントロン II) — (コザック配列) — (赤、緑色発光タンパク) —
(SV40 ポリ A 配列))を培養纖維芽細胞 NIH3T3 で共発現させた。共発現細胞を破碎し細
胞抽出物の鉄道虫由来赤色、緑色発光タンパクの発光スペクトルを実施例2と同様な手
法で測定した。図5は共発現細胞の発光スペクトルである。赤色、緑色発光タンパクが発
15 光することで2つのピークが観察されるスペクトルとなった。これは2つの遺伝子転写活
性を同時に測定した結果である。この発光活性を、フォトマルを用いたルミノメータで測定
すれば、2つの鉄道虫由来赤色、緑色発光タンパク遺伝子の発光活性の総計となる。そ
こで、緑色発光タンパクの発光活性だけを測定するため、赤色発光タンパクの光をカット
することにした。発光スペクトルから評価して、図5の点線で示す光波長カットフィルターを
20 選択した。このフィルターを用いると、緑色発光タンパク活性の8%、赤発光タンパク活性
の76%が検出可能であり、換算することで赤色、緑色発光タンパクの発光量、存在量を
評価することができる。

実施例5

- 25 赤色、緑色発光タンパクを個々に含む細胞抽出液50 μ L にピッカジーン50 μ L 添加
し、ATT0(株)社製ディッシュ型ルミノメータ AB2500 を用いて1分間隔で発光活性を測定
し、図6のような発光反応曲線を得た。反応開始後5分以内では活性は安定しないが、6
分後では両方共に安定な発光活性を示した。そこで、赤色、緑色発光タンパク遺伝子を
共発現させた細胞の発光活性の測定を行う際、この発光反応の安定化した時間帯で測

定した。測定手順は、1) フィルター (Hoya 社製カラーフィルターR-54型) なしで発光量を測定する(赤色、緑色発光タンパクの発光活性)。2) 実施例4で決定したフィルター (Hoya 社製カラーフィルターR-54型) をルミノメータに挿入、発光量を測定、緑色発光タンパクの発光活性とする。3) フィルター (Hoya 社製カラーフィルターR-54型) の透過率を換算
5 することで赤色の発光活性を算出する。

実施例6

実施例5で決めた手順で存在比の異なる赤色、緑色発光タンパクを定量できるかをモデル実験で検証した。図7は赤色、緑色発光タンパクの存在比を変えたサンプルについて、1)全発光量の測定、2)緑色発光タンパクのみ測定、3)赤色、緑色発光タンパク量の定量、を行った。その結果、それぞれの存在比に対して直線関係で変化することが明らかとなった。これは、細胞内で異なる発現量を示した赤色、緑色発光タンパク量を、カラーフィルター (Hoya 社製カラーフィルターR-54型) を挿入したルミノメータで定量化できることを示している。

15

実施例7

本システムの有効性を検証するため、2つの時計遺伝子の遺伝子転写活性を測定、同時に3つ目の遺伝子転写活性として定常的な遺伝子転写活性を示すプロモータを用いて、2つの時計遺伝子の転写活性を標準化した。具体的には、マウス Per1 プロモータ内の E-box3, 4, 5 を連結したエレメント (E54) – (ニワトリ β アクチングロブリンプロモータ) – (β -グロビンインtron II) – (コザック配列) – (赤色発光タンパク) – (SV40 ポリ A 配列) 遺伝子、およびマウス BMAL1 のプロモータ内の REV-ERV/ROR エレメント1, 2 (RORE) – (ニワトリ β アクチングロブリンプロモータ) – (β -グロビンインtron II) – (コザック配列) – (緑色発光タンパク) – (SV40 ポリ A 配列) 遺伝子、および標準化用青色発光タンパクベクター (phRL-TK、Promega) を、ヒト BMAL1、ヒト CLOCK、マウス ROR・4 発現ベクターと共に NIH3T3 細胞にコントラスフェクションした。24時間後細胞を破碎し、スペクトロメータを用いて細胞内でのルシフェラーゼ発光波長の解析を行った。その結果、これら 2 種のルシフェラーゼに由来する発光波長の検出が認められ、またこれらは個々のルシフェラーゼを単独で発現させたものと同一の発光スペクトルを示した。そこで実施例6で決定した方法により赤およ

び緑色ルシフェラーゼの発光活性を測定した。更にこの活性値を青色発光タンパクの活性値で標準化した各々の転写活性を図8に示す。個別の実験において、BMAL1 及び CLOCK タンパクが細胞内に発現すると E-box3, 4, 5 を連結したエレメント(E54)プロモータは活性化、(ROR \cdot)プロモータは不活性化されるのに対して、マウス ROR \cdot 4 が細胞内で 5 発現すると(ROR \cdot)プロモータが大きく活性化することが知られている。本実験において同時に測定された赤、緑色発光タンパクの活性は(E54)プロモータ及び(ROR \cdot)プロモータ活性は転写活性の違いを定量的に示している。

実施例8

10 鉄道虫由来赤色、緑色発光タンパク遺伝子((CMV エンハンサ) – (ニワトリ β アクチングロモータ) – (β -グロビンイントロン II) – (コザック配列) – (赤、緑色発光タンパク) – (SV40 ポリ A 配列)) および青色発光タンパクベクター(phRL-TK、Promega)を培養纖維芽細胞 NIH3T3 で共発現させた。共発現細胞を破碎し細胞抽出物の鉄道虫由来赤色、緑色発光タンパクおよびウミシイタケ由来青色発光タンパクの発光スペクトルを実施例2と同様な手法で測定した。図9は共発現細胞の発光スペクトルである。赤色、緑色、青色発光タンパクが発する3つのピークが観察され、スペクトル上のピークの高さはそれぞれのプロモータ活性の高さを反映している。発光色を識別可能なフィルターを持つ発光量計測測定装置によって赤色、緑色、青色の発光量を換算することによって、3つの遺伝子転写活性を評価できる。

20

実施例9

鉄道虫由来赤色、緑色発光タンパク遺伝子((CMV エンハンサ) – (ニワトリ β アクチングロモータ) – (β -グロビンイントロン II) – (コザック配列) – (赤、緑色発光タンパク) – (SV40 ポリ A 配列)) 遺伝子を培養纖維芽細胞 NIH3T3 にリポフェクションにより導入し、1 25 6時間培養後、100nM のデキサメタゾンを含む培養液に置換し2時間培養した。その後、100 μ M のホタルルシフェリンを含む培養液に交換し、ATT0 (株)社製ディッシュ型ルミノメータ AB2500 で赤色、緑色発光タンパクの発光活性を連続的に測定した。図10は転写活性を連続的に測定した結果であり、発光する色を識別する連続発光量計測測定装置を用いれば、2つの転写活性を連続的に測定することが可能である。

実施例10

哺乳類細胞内での発現を安定化するために鉄道虫赤色発光タンパクの配列を下記の点に気をつけて設計した。1) 転写因子結合部位の34箇所(48個のDNA配列)を変更(表4)、2) コドン使用頻度を哺乳類により近くするために279個のDNA配列を変更(表5)、3) 一般的な制限酵素部位15箇所(45個のDNA配列内4箇所は転写因子結合部位と同じ)を変更(表6)して配列番号7の配列を設計し、人工的に構築物(配列番号7)を作成した。本配列は天然型鉄道虫赤色発光タンパク遺伝子(配列番号3)との相同性は77.5%、WO2003/016839に記載の赤色発光タンパク変異体(配列番号6)との相同性は82.8%である(図13、図14)。

10

表 4

予想される転写因子	位置番号		変異配列(斜字は変異部分)
Octamer-binding factor 1	89 - 103	(A99T)	cagcaggactacaattatataaatcattat ataaaatcc tta ta ttactgacggataatcgatgccataccac
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	91-101	(T96C) (A99G)	gcaggactacaattatataatcattat aaata <u>ctcgtat</u> attactgacggataatcgatgccatac
Myf5 myogenic bHLH protein	164 - 178	(C168A) (C171T)	caatgaagaataatcatatgctcaaaattt tgaaac <u>aggttg</u> ccgtt tggcagttagtcagaaaaatatggcttgg
E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	186 - 200	(A195G)	aatatttgaaacccagtcgcgccttggcagt tagtctagaga aata tggcttggatcataacaatgttgtggcaat
cellular and viral TATA box elements	268 - 284	(T276C) (T277C)	gaaaacaacatacacacttttgcgcctta attgtgc <u>ccta</u> tacca aggaataccaatggcaacatcaatatgat
Ikaros 3, potential regulator of lymphocyte differentiation	281 - 293	(A288G)	Actttttgcgccttaattgtctgtttat accaagg <u>gatac</u> c aatggcaacatcaaataatgtatgtacacaga
cellular and viral CCAAT box	332 - 342	(T336C)	catcaaataatgtatgtacacagaaaaggaga tgat <u>ggccat</u> ttgaatatatcggaaaccatgcctttagttt
Mammalian C-type LTR TATA box	424 - 440	(C426T) (T429C)	tttattctgaaagtacaaaaacatctagat tt <u>tttcaaaaaa</u> gtcat agtcatgtatgtatgtacgatataatgg
TCF/LEF-1, involved in the Wnt signal transduction pathway	484 - 500	(C489T)	atgtacgatataatggcgttgaatgcgtt tttag <u>ttttttt</u> cacg ttatactgtatcgcgccttigatccaggatgaa
X-box-binding protein 1	491 - 505	(T501G)	atacataatggcgttgaatgcgtttagct ttgtttcacggta ta ctgatcacgcctttagccatggaaattta
TCF/LEF-1, involved in the Wnt signal transduction pathway	511 - 527	(C516G) (T519C)	gtatttagcttgcgttacgttataactgtat cacgc <u>gttgcgtat</u> cagt gaaatthaacccaaaagaggtttgatccctt
Hox-1.3, vertebrate homeobox protein	562 - 578	(A570G) (T571C)	tttaacccaaaaaggtttgatcccttggaa agaaccc <u>gcgt</u> aattat gacatcatctggaaacactggatgtccctaa
COMP1, cooperates with myogenic proteins in multicomponent complex	593 - 613	(A600C) (T601C)	gaacccgttataattatgacatcatctggaa caactgg <u>cctg</u> cctaaagggg tagtaataagccatagaagtataactataaa
Prostate-specific homeodomain protein NKX3.1	626 - 638	(A630G)	ctggattgcctaaagggttagtaataagcc atagg <u>gtata</u> ac tataagatccgtccatagcagtgtatcccatt
POU factor Brn-2 (N-Oct 3)	817 - 833	(A822C)	aagaaaatttggggcgaattcttctaaaa accat <u>ccaaaaa</u> ttacaa aatcgcttattgttagttccctccat
Pu.1 (Pu120) Ets-like transcription factor identified in lymphoid B-cells	844 - 860	(T828C)	aggcgaattcttctaaaaaccataca <u>aaactacaaaatc</u> gccttctattgttagttccctccatattgt

Hox-1.3, vertebrate-homeobox protein	880 - 896	(A888T) (T889C)	gttcctccatattggatatggct aaaagtcc <u>tcta</u> gtcga tgaatacaattatcgagcttaacgaaat
transcriptional repressor CDP complex of Lmo2 bound to Tal-1, E2A proteins, and GATA-1, half-site 2	903 - 919 951 - 963	(T907C) (A909G) (T957C)	tttggctaaaaggccatttagtcgatgaata caat <u>ct</u> <u>gtcgag</u> c ttaacggaaattgtgtggagggtctccctttagg aagaga <u>catcg</u> ggaaattgtgtggagggtctccctttagg aagaga <u>catcg</u> ca gataaagttagacaagagattgaaagtacat
TCF/LEF-1, involved in the Wnt signal transduction pathway	967 - 983	(A975C)	gggtctccctttagaagagatatcgagat aaagt <u>gc</u> gagatt gaaagtacatgaaatccataaggatattgg
Prostate-specific homeodomain protein NKK3.1	1036 - 1048	(T1044G)	ggatatggattaaccgaaacctgcagcgct ctaata <u>act</u> <u>gag</u> cc ccaatgatcgagaactaaaaaagggtcaa
transcriptional repressor CDP	1049 - 1065	(T1053C) (C1057A)	ccggaaaacctgcagcgcttaacttagcc ccaa <u>cgat</u> <u>tg</u> agaactt aaaaagggtcaattgaaacgcctatgcca
Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	1066 - 1086	(A1071G)	ctaatacttagccccatgtatcgagaactt aaaaagggtgc aattgaaacg cctatgccatattgtcaagttaaaggattata
Octamer-binding factor 1, POU-specific domain	1158 - 1170	(A1161G) (A1164T)	tgggaaggcgcttaggccaagagaaaaagg cg <u>at</u> <u>gt</u> ttc aaaaaggatcaatgttattgaaaggatattcac
Ecotropic viral integration site 1 encoded factor	1182 - 1198	(A1191G) (A1194C)	aaaaggcgaaatatgcttcaaaaggatcaat gcttatgagg gt <u>atc</u> acaacaatccgc <u>aagg</u> caactcgatgtatgc
Nuclear factor Y (Y-box binding factor)	1236 - 1250	(T1242G)	tccgcaagcaactcgatgtatgc <u>tt</u> gacaa agatgggtggc ttca tactgggatcttggatattacgacgaga
Prostate-specific homeodomain protein NKK3.1	1309 - 1321	(A1314G)	gacagatttatctatgtatgtatcgattg aaaga <u>gtt</u> attta aatataaaggatattcaggatgtgcgcctgt
Special AT-rich sequence-binding protein 1, predominantly expressed in thymocytes, binds to matrix attachment regions (MARs)	1314 - 1330	(T1317C) (T1320C)	attatctatgtatgtatcgattgaaaga act <u>cat</u> <u>aaat</u> at aaag gatatcagggtgcgcctgt <u>actggaaa</u>
Octamer-binding factor 1	1373 - 1387	(T1377C)	cgccctgt <u>actggaaa</u> atctgtttac aaca <u>cccaat</u> attt ctgatcgccgttattggatccgcacg
POU factor Brn-2 (N-Oct 3)	1379 - 1395	(A1380T)	ctgaactggaaaatctgtttacacatc c <u>at</u> atttctg atgcg ggttattggatccgcacgatattgt
Octamer-binding factor 1	1399 - 1413	(T1401C)	ttacaacatccaaatattctgtatgcgggt gt <u>at</u> ttggatt ccg gacgatattgtgtcaattacccgc
Binding site for a Pbx1/Meis1 heterodimer	1422 - 1438	(A1431G)	tgcgggttattggatccgcacgaaatt tgcttgtcaatttgcgtt acattt ccgcgtgttgtgttagagcctggtaaga
GATA-binding factor 2	1548 - 1560	(A1551C) (T1554C)	aactaaacatctcgaggccgtgcgtatt tat <u>cgac</u> atgt t cccaaaggccaaacaggaaaactcatgaga
Cart-1 (cartilage homeoprotein 1)	1624 - 1640	(T1636C)	gaactccgtcaatatttgccggaaacag gcaaaatcaa aactata a

表 5

	Amino Acid Codon	RED complete		RED-mutant		
		#	%	#	%	
5	Met ATG	14	100.0	14	100.0	
	Trp TGG	1	100.0	1	100.0	
	Glu GAA	26	83.9	3	9.7	
	GAG	5	16.1	28	90.3	
10	Phe TTT	19	76.0	7	28.0	
	TTC	6	24.0	18	72.0	
	Asp GAT	25	83.3	16	53.3	
	GAC	5	16.7	14	46.7	
	Cys TGT	3	33.3	5	55.6	
	TGC	6	66.7	4	44.4	
15	His CAT	12	80.0	0	0.0	
	CAC	3	20.0	15	100.0	
	Gln CAA	12	80.0	0	0.0	
	CAG	3	20.0	15	100.0	
20	Asn AAT	13	65.0	2	10.0	
	AAC	7	35.0	18	90.0	
	Tyr TAT	17	70.8	9	37.5	
	TAC	7	29.2	15	62.5	
	Lys AAA	32	82.1	6	15.4	
	AAG	7	17.9	33	84.6	
25	Ile ATT	20	43.5	6	13.0	
	ATC	8	17.4	40	87.0	
	ATA	18	39.1	0	0.0	
	*** TAA	1	100.0	1	100.0	
30	TAG	0	0.0	0	0.0	
	TGA	0	0.0	0	0.0	
	Thr ACT	11	37.9	0	0.0	
	ACC	7	24.1	21	72.4	
	ACA	9	31.0	8	27.6	
	ACG	2	6.9	0	0.0	
35	Pro CCT	11	35.5	15	48.4	
	CCC	3	9.7	4	12.9	
	CCA	14	45.2	11	35.5	
	CCG	3	9.7	1	3.2	
40	Ala GCT	13	37.1	3	8.6	
	GCC	4	11.4	30	85.7	
	GCA	14	40.0	0	0.0	
	GCG	4	11.4	2	5.7	
45	Gly GGT	7	17.5	0	0.0	
	GGC	9	22.5	34	85.0	
	GGA	20	50.0	4	10.0	
	GGG	4	10.0	2	5.0	
	Val GTT	14	36.8	0	0.0	
	GTC	6	15.8	5	13.2	
	GTA	13	34.2	0	0.0	
50		GTG	5	13.2	33	86.8
	Arg AGA	8	40.0	8	40.0	
	AGG	1	5.0	4	20.0	
	CGT	6	30.0	0	0.0	
55		CGC	1	5.0	4	20.0
	CGA	3	15.0	0	0.0	
	CGG	1	5.0	4	20.0	
	Ser AGT	8	25.0	2	6.3	
	AGC	7	21.9	13	40.6	
60		TCT	4	12.5	4	12.5
	TCC	1	3.1	13	40.6	
	TCA	10	31.3	0	0.0	
	TCG	2	6.3	0	0.0	
65	Leu CTT	13	25.0	1	1.9	
	CTC	3	5.8	2	3.8	
	CTA	9	17.3	1	1.9	
	CTG	4	7.7	47	90.4	
	TTA	15	28.8	0	0.0	
	TTG	8	15.4	1	1.9	

表 6

制限酵素部位	変更前の配列	変更後の配列
35 BssSI	Ctggtg	Ctcgga
92 SsPI	Aatatt	Aatact
118 ClaI	Atcgat	Atcgac
146 NdeI	Catatg	Cctatg
155 SsPI	Aatatt	Gatttt
189 XbaI	Tctaga	Cctgga
282 EcoT14I	Ccaagg	Ccaggg
417 XbaI	Tctaga	Cctgga
460 EcoRV	Gatatc	Gacatc
524 ApoI	Aaattt	Aagttc
553 EcoT14I	Ccttgg	Ccctgg
570 PshBI	Attaat	Gctgat
769 Af1III	Cttaag	Ctgaag
790 ApoI	Aaattt	Aagttt
802 ApoI, EcoRI	Gaattc	Gagttc
955 EcoRV	Gatatc	Gacatc
1030 Aor51HI	Agcgct	Agcgcc
1076 MunI	Caattg	Ccatcg
1094 NdeI	Catatg	Cctatg
1117 EcoRV	Gatatc	Gacatc
1193 EcoRV	Gatatc	Gctacc
1217 BssSI	Ctcgt	Ccagg
1301 ClaI	Atcgat	Atcgac
1331 EcoRV	Gatatc	Gctacc
1381 SspI	Aatatt	Aacatc
1406 EcoRI, ApoI	Gaattc	Gcatcc
1410 AccIII	Tccgga	Cccaga
1417 ApoI	Gaattt	Gagttt
1605 SspI	Aatatt	Catctt
1613 SmaI	Cccggg	Cccgcg

実施例11

野生型と変異型の発光タンパク遺伝子を3種のプロモータ配列(CMV、SV40、CAG

- 5 {CAG; (CMV エンハンサ) – (ニワトリ β アクチンプロモータ) – (β -グロビンイントロン II)
– (コザック配列)} の下流に挿入したベクターを作成した(野生型; CMV-Red, CAG-Red,
変異型; CMV-REDm, CAG-REDm)。この際、ペルオキシゾーム移行配列として知られる

C末端の SKL 配列を削除したものも作成した(野生型; SV40-Red(-SKL)、変異型; SV40-REDm(-SKL), CAG-REDm(-SKL))。

それぞれの遺伝子を培養纖維芽細胞 NIH3T3 細胞にリポフェクタミンを用いて導入、2 4時間後の細胞内の発光活性を測定した(図15)。発光活性の測定には基質として発光
5 基質混合溶液(東洋ビーネット社製)を、発光測定装置はアトー(株)製 AB-2000 を用い
た。サンプルは細胞抽出液 50 μL にピッカジーン 50 μL を加えた。その結果、CMV-Red、
SV40-Red(-SKL)では 1000RLU 前後であるが、CMV-REDm、SV40-REDm(-SKL)にお
いて $2 \times 10^7 - 4 \times 10^7$ RLU の値を示した。また、図15に示すように、CAG-Red でも高い活
性は認められていたが、変異体を用いることで2倍程度の活性上昇が認められた。SKL
10 配列は活性上昇に有効な方法と考えられていたが、数%の活性上昇に留まった。これら
の結果、CAG および REDm は哺乳類遺伝子発現解析用レポータ遺伝子として有用で
あることが明らかとなった。実施例10の手法で鉄道虫発光タンパクの哺乳類細胞での安
定発現化が可能であることから、同様な手順で鉄道虫緑色発光タンパクの遺伝子配列を
改変した(配列番号16)。改変配列は野生型に比べて 16箇所の転写因子結合部位を
15 改変し、相同性が76%となっている。

実施例12

哺乳類細胞内で発現した鉄道虫由来、赤色発光タンパク遺伝子の発光スペクトル解
析を行った。最も高い活性を示した CMV-REDm 遺伝子を導入した細胞(マウス由来
NIH3T3、ラット由来 Rat-1、ヒト由来 A543 細胞)の抽出液 15 μL にピッカジーン 15 μL を
20 加え、アトー(株)製微弱発光スペクトル測定装置を用いて発光スペクトルを測定した。ま
た、参考のためカイコ昆虫細胞に配列番号3に記載の遺伝子を導入した細胞の抽出液
の発光スペクトルを測定した。図16は、マウス由来 NIH3T3 細胞(太線)及びカイコ昆虫
細胞(細線)において発現させた場合の発光スペクトルであり、マウス由来 NIH3T3 細胞
では最大発光波長 630nm、カイコ細胞由来では最大発光波長 622nm 前後のスペクトル
25 が得られた。本スペクトルは pH や周りの溶液の影響を受けず、常に同じスペクトルを示し
た。また、ラット由来 Rat-1、ヒト由来 A543 細胞でも最大発光波長 630nm のスペクトルで
あつた。

実施例13

哺乳類細胞内での発現を安定化させるために、野生型のイリオモテボタル緑色発光タンパク(遺伝子配列を配列番号8に、アミノ酸配列を配列番号12に各々示す)および野生型のイリオモテボタル橙色発光タンパク(遺伝子配列を配列番号9に、アミノ酸配列を配列番号13に各々示す)の配列を下記の点に気をつけて設計し、人工的に構築物を作成した。

- 1) 転写因子結合部位の15箇所(20個のDNA配列)を変更(表7)、
 - 2) コドン使用頻度を哺乳類により近くするために322個のDNA配列を変更(表8)、
 - 3) 一般的な制限酵素部位30箇所(49個のDNA配列内2箇所は転写因子結合部位と同じ)を変更(表9)。
- 10 表8, 9中、RoLWTは野生型イリオモテボタル発光タンパクを示し、RoLmは変異型イリオモテボタル発光タンパクを示す。
- 得られた変異型のイリオモテボタル緑色発光タンパクの遺伝子配列を配列番号10に、アミノ酸配列を配列番号14に各々示す。また、変異型のイリオモテボタル橙色発光タンパクの遺伝子配列を配列番号11に、アミノ酸配列を配列番号15に各々示す。
- 15 変異型のイリオモテボタル緑色発光タンパクの遺伝子配列(配列番号10)と天然型のイリオモテボタル緑色発光タンパクの遺伝子配列(配列番号8)との相同性は76.0%である(図17)

表7

予想される転写因子	変異番号	変異配列(斜字は変異部分)	
Activator protein 4	64 - 80	(C69T) (G75C)	cccagggacccctggacctggcaccgcc ggc <u>at</u> c <u>gt</u> ct ctacag agcc <u>ct</u> gaccaactt <u>tc</u> tt <u>tc</u> t <u>tg</u> aggga
RAR-related orphan receptor alpha2	81 - 97	(A81G)	cctgggac <u>cc</u> gg <u>cc</u> cat <u>cc</u> ag <u>ct</u> gtac <u>ag</u> g <u>cc</u> c <u>ct</u> gac <u>cc</u> actt <u>ct</u> c <u>tc</u> tt <u>tg</u> agg <u>gg</u> agg <u>cc</u> ct <u>tg</u> ac <u>gc</u> g <u>cc</u>
Nuclear factor 1	169 - 187	(C183T)	gtgg <u>gt</u> ct <u>ta</u> c <u>cc</u> g <u>ca</u> c <u>at</u> c <u>tc</u> gg <u>ga</u> ac ag <u>ct</u> gt <u>ag</u> act <u>g</u> g <u>ct</u> ta <u>at</u> g u <u>ct</u> ac <u>ga</u> a <u>ct</u> ac <u>gg</u> c <u>ct</u> g <u>cc</u> g <u>aa</u> aca
Progesterone receptor binding site	237 - 255	(C243T)	g <u>cc</u> cc <u>aa</u> ac <u>ag</u> gt <u>at</u> cc <u>cg</u> tg <u>ca</u> g <u>g</u> ag <u>aa</u> <u>f</u> ag <u>ca</u> c cat <u>tc</u> tc <u>ta</u> cccc <u>gt</u> at <u>cc</u> g <u>cc</u> ct <u>gt</u> ac <u>at</u> u <u>g</u>
Tumor suppressor p53 (5' half site)	458 - 478	(C462T)	t <u>ca</u> aga <u>ag</u> gt <u>gg</u> gt <u>ct</u> g <u>ct</u> gg <u>ac</u> ag <u>ca</u> agg ag <u>ga</u> <u>at</u> gg <u>gg</u> g agg <u>cc</u> ca <u>gt</u> gc <u>ct</u> g <u>ag</u> ca <u>ac</u> tt <u>ca</u> tg <u>gg</u> cc <u>gg</u> t <u>ac</u> tc <u>cc</u>
Tumor suppressor p53 (5' half site)	563 - 583	(G573T) (C576T)	t <u>ca</u> ag <u>cc</u> aa <u>gg</u> g <u>ac</u> tt <u>cg</u> ac <u>g</u> cc <u>aa</u> agg <u>gg</u> g <u>ac</u> gg <u>tt</u> gg <u>cc</u> ct <u>ta</u> <u>tt</u> at <u>gt</u> tc <u>ct</u> c <u>ct</u> tc <u>gg</u> c <u>ac</u> cc <u>ac</u> cc <u>gg</u> ct <u>gc</u> aa <u>ag</u> gg <u>cg</u>
Zinc finger transcription factor ZBP-89	850 - 864	(C858T) (C861T)	at <u>cg</u> aga <u>ag</u> ta <u>ca</u> ga <u>at</u> cc <u>aa</u> ac <u>at</u> cg <u>tg</u> ct <u>gg</u> cc <u>cc</u> <u>t</u> <u>cc</u> <u>t</u> gt <u>g</u> at <u>gg</u> gt <u>tt</u> ct <u>gg</u> cc <u>aa</u> ag <u>g</u> ag <u>cc</u> cc <u>ct</u> gt <u>tg</u>
Nuclear factor 1	865 - 883	(C879T)	at <u>cc</u> ca <u>ac</u> aa <u>at</u> cg <u>tg</u> tg <u>gg</u> cc <u>cc</u> cc <u>cc</u> tg at <u>gg</u> gt <u>tt</u> ct <u>tg</u> g <u>ct</u> u <u>aa</u> g <u>g</u> cc <u>cc</u> ct <u>gg</u> tg <u>gg</u> ac <u>ca</u> gt <u>ac</u> g <u>ac</u> ct <u>gt</u> cc <u>ca</u>
Member of b-zip family, induced by ER damage/stress, binds to the ERSE in association with NF-Y	950 - 964	(G960T)	g <u>ag</u> gg <u>gt</u> gg <u>cc</u> ac <u>cc</u> gg <u>gg</u> gg <u>cc</u> ct <u>gt</u> gg g <u>acc</u> gg <u>gt</u> <u>t</u> g <u>cc</u> cg t <u>gg</u> cc <u>gt</u> gg <u>cc</u> aa <u>g</u> cg <u>gt</u> g <u>aa</u> g <u>at</u> cg <u>cg</u>
X-box-binding protein 1	1252 - 1266	(C1263A)	g <u>cc</u> at <u>cg</u> ac <u>aa</u> ag <u>gg</u> gg <u>gt</u> gg <u>ct</u> g <u>u</u> act <u>cc</u> g <u>gc</u> g <u>ac</u> gt <u>gg</u> <u>at</u> ac t <u>ac</u> g <u>ac</u> g <u>ac</u> g <u>at</u> g <u>cc</u> act <u>tc</u> tg <u>gt</u> gg <u>tg</u>
H6 homeodomain HMX3/Nkx5.1 transcription factor	1278 - 1290	(C1281A) (C1284T)	ct <u>cc</u> gg <u>cg</u> ac <u>gt</u> gg <u>gg</u> ct <u>ac</u> ta <u>cg</u> ac <u>g</u> ca <u>g</u> tg <u>g</u> <u>ca</u> <u>tt</u> ct <u>tt</u> c <u>tg</u> gg <u>tg</u> ac <u>gg</u> gg <u>ct</u> g <u>ta</u> gg <u>gg</u> g <u>ac</u> gt <u>g</u> at <u>ca</u> ag
Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (mouse)	1302 - 1322	(G1308A)	cg <u>ac</u> gt <u>gg</u> cc <u>ac</u> tt <u>tc</u> tg <u>gt</u> gg <u>ac</u> cg g <u>ct</u> g <u>aa</u> <u>g</u> ag <u>ct</u> g <u>at</u> ca <u>ag</u> ta ca <u>gg</u> g <u>ct</u> ac <u>cc</u> ag <u>gt</u> gg <u>cc</u> cc <u>cc</u> g <u>ag</u> ct
Winged helix protein, involved in hair keratinization and thymus epithelium differentiation	1385 - 1395	(C1389T)	A <u>gt</u> gg <u>ct</u> g <u>ct</u> g <u>tc</u> cc <u>ag</u> cc <u>cc</u> at <u>cc</u> at <u>ca</u> g <u>gg</u> <u>at</u> g <u>cc</u> gc gt <u>g</u> ac <u>cc</u> gg <u>cg</u> gt <u>cc</u> cc <u>ac</u> g <u>gg</u> cc <u>cc</u> gg <u>cc</u>
NF-kappaB (p50)	(1502-1516)	(G1506A) (C1512T)	cc <u>g</u> ag <u>cc</u> gg <u>ag</u> at <u>ca</u> tc <u>g</u> act <u>ac</u> at <u>cg</u> cc <u>g</u> ag <u>cg</u> <u>at</u> gt <u>tc</u> <u>c</u> cca <u>cc</u> aa <u>g</u> cg <u>ca</u> tc <u>gg</u> gg <u>gg</u> cg <u>gt</u> ct <u>tc</u> g
Winged helix protein, involved in hair keratinization and thymus epithelium differentiation	1531 - 1541	(C1536A)	g <u>ag</u> cc <u>gg</u> gt <u>tc</u> cc <u>cc</u> ac <u>ca</u> g <u>g</u> c <u>at</u> cc <u>gg</u> gg <u>cc</u> gg <u>at</u> gt <u>cg</u> ct <u>tc</u> gt <u>gg</u> ac <u>ca</u> tc <u>cc</u> ca <u>ag</u> gg <u>gg</u> cg <u>cc</u> ac

表8

	Amino Acid Codon	RoL WT		RoLm	
		#	%	#	%
5	Met ATG	10	1.84	10	1.84
10	Trp TGG	2	0.37	2	0.37
	Glu GAA	31	5.7	1	0.18
	GAG	5	0.92	35	6.43
15	Phe TTT	11	2.02	0	0
	TTC	13	2.39	24	4.41
	Asp GAT	15	2.76	3	0.55
20	GAC	12	2.21	24	4.41
	Cys TGT	5	0.92	1	0.18
	TGC	5	0.92	9	1.65
25	His CAT	8	1.47	1	0.18
	CAC	2	0.37	9	1.65
	Gln CAA	9	1.65	0	0
	CAG	4	0.74	13	2.39
30	Asn AAT	11	2.02	1	0.18
	AAC	7	1.29	17	3.12
	Tyr TAT	11	2.02	0	0
35	TAC	8	1.47	19	3.49
	Lys AAA	28	5.15	1	0.18
	AAG	12	2.21	39	7.17
40	Ile ATT	19	3.49	2	0.37
	ATC	10	1.84	34	6.25
	ATA	7	1.29	0	0
45	*** TAA	1	0.18	1	0.18
	TAG	0	0	0	0
	TGA	0	0	0	0
	Thr ACT	9	1.65	0	0
	ACC	13	2.39	30	5.51
50	ACA	5	0.92	2	0.37
	ACG	5	0.92	0	0
	Pro CCT	6	1.1	4	0.74
	CCC	8	1.47	16	2.94
	CCA	7	1.29	4	0.74
55	CCG	4	0.74	0	0
	Ala GCT	14	2.57	4	0.74
	GCC	10	1.84	35	6.43
	GCA	8	1.47	0	0
60	GCG	6	1.1	0	0
	Gly GGT	6	1.1	0	0
	GGC	7	1.29	34	6.25
	GGG	18	3.31	5	0.92
65		8	1.47	0	0
	Val GTT	14	2.57	1	0.18
	GTC	10	1.84	3	0.55
70	GTA	17	3.12	1	0.18
	GTG	6	1.1	42	7.72
	Arg AGA	8	1.47	9	1.65
	AGG	4	0.74	7	1.29
75	CGT	3	0.55	0	0
	CGC	4	0.74	3	0.55
	CGA	5	0.92	1	0.18
	CGG	2	0.37	6	1.1
80	Ser AGT	6	1.1	0	0
	AGC	8	1.47	14	2.57
	TCT	7	1.29	3	0.55
	TCC	3	0.55	17	3.12
	TCA	3	0.55	0	0
85		7	1.29	0	0
	Leu TTA	19	3.49	0	0
	TTG	16	2.94	0	0
	CTT	12	2.21	1	0.18
90	CTC	1	0.18	4	0.74
	CTA	3	0.55	0	0
	CTG	6	1.1	52	9.56

表 9

	制限酵素部位	RoLWT	ROLm
5	35 AvaI	CTCGAG	CCAGGG
	35 XbaI	CTCGAG	CCAGGG
	59 PstI	CTGCAG	CCGCCG
	65 ApoI	GAATTTC	GCATTC
	65 EcoRI	GAATTTC	GCATTC
	70 MunI	CAATTG	CAGCTC
10	90 ApoI	GAATTTC	CAACTT
	438 SacI	AGTACT	GGTGCT
	528 ApoI	AAATTTC	AAACTT
	532 DraI	TTTAAA	TTCAAG
	618 HincII	GTTAAC	GCTGAC
	618 HpaI	GTTAAC	GCTGAC
15	630 ApoI	AAATTTC	GAACCT
	660 BamHI	GGATCC	GGACCC
	744 Psp1406I	AACGTT	AACCCT
	793 BspT104I	TTCGAA	TTCGAG
	810 AflII	CTTAAG	CCTGAG
	833 ApoI	GAATTTC	GAATCC
20	833 EcoRI	GAATTTC	GAATCC
	931 AgeI	ACCGGT	ACCGGC
	1038 PshBI	ATTAAT	GCTGAT
	1050 BspHI	TCATGA	CCACGA
	1113 BglII	AGATCT	GGACCT
	1165 DraI	TTTAAA	TTCAAG
25	1225 ClaI	ATCGAT	ATCGAC
	1273 PshAI	GACGATGGTC	GACGATGGAC
	1296 PvuI	CGATCG	GGACCG
	1302 DraI	TTTAAA	GCTGAA
	1328 EcoRV	GATATC	GCTACC
	1523 Bst1107I	GTATAC	GCATCC

35 実施例14

野生型と変異型の発光タンパク遺伝子(イリオモテボタル由来の橙色および緑色)を3種のプロモータ配列 SV40 の下流に挿入したベクターを作成した(野生型;SV40-RoL(Green), SV40-RoL(Orange)、変異型;SV40-RoL(Green)m, SV40-RoL(Orange)m)。それぞれの遺伝子を培養纖維芽細胞 NIH3T3 細胞にリポフェクタミンプラスを用いて導入、

24時間後の細胞内の発光活性を測定した。発光活性の測定には基質として発光基質混合溶液(東洋ビーネット社製)を、発光測定装置はベルトールド製 LB9506 を用いた。サンプルは細胞抽出液 50 μL にピッカジーン 50 μL を加えた。その結果、野生型 SV40-RoL(Green), SV40-RoL(Orange)ではそれぞれ 1×10^6 , 4×10^5 RLU 前後であるが、SV40-RoL(Green)m, SV40-RoL(Orange)m において 5×10^8 , 8×10^7 RLU の値を示した。図18において野生型と変異型を比較すると、野生型を1として場合と、緑色発光タンパクではおよそ活性値として約44倍、橙色では約57倍に増加した。これらの結果、変異体は哺乳類遺伝子発現解析用レポータ遺伝子として有用であることが明らかとなった。

10 実施例15

哺乳類内の 3 つの遺伝子転写活性を同時に、且つ一つの発光基質で測定する方法の概略を図19に示す。鉄道虫由来赤色、イリオモテボタル緑、橙色発光タンパク遺伝子上流にプロモータ配列を挿入した 3 つの遺伝子ベクターを培養細胞等に共発現させる。細胞処理後、一定時間経過した共発現細胞を破碎し細胞抽出物の鉄道虫由来赤色、イリオモテボタル緑、橙色発光タンパクの発光活性をカラーフィルターで分離することで 3 つの転写活性を測定する。そこで、哺乳類細胞内で個々に発現した鉄道虫由来赤色、イリオモテボタル緑色、橙色発光タンパクについて遺伝子を導入した細胞の抽出液 15 μL にピッカジーン 15 μL を加え、アトー(株)製微弱発光スペクトル測定装置を用いて発光スペクトルを測定した(図20)。発光スペクトルを検討した結果、緑色と橙色発光を分割するため Hoya 社製カラーフィルター 0-54 型を選択、また橙色と赤色発光を分割するために Hoya 社製カラーフィルター R-60 型を選択することで色分割が可能であることを確認した。測定手順は、1) フィルターなしで発光量を測定する(赤色、橙、緑色発光タンパクの発光活性)。2) カラーフィルター 0-54 型で決定したフィルターをルミノメータに挿入、発光量を測定、緑色発光タンパクの発光活性とする。3) カラーフィルター R-60 型で決定したフィルターをルミノメータに挿入、発光量を測定、緑及び橙色発光タンパクの発光活性とする。4) フィルターの透過率を換算することで赤色の発光活性を算出、さらに 3 色の発光タンパクの活性を補正する。このように、赤色、緑、橙色発光タンパクの発光量、存在量を評価することができる。

実施例16

- 実施例15で決めた手順で存在比の異なる赤色、橙、緑色発光タンパクのうち2つの異なる組成の酵素を定量できるかをモデル実験で検証した。図21(A)は赤色、緑色発光タンパクについて、(B)は緑色、橙色発光タンパクについて、そして(C)は橙色、赤色発光タンパクについて、それぞれ存在比を変えたサンプルについて1)全発光量の測定、2)設定したフィルターを用いて測定、換算し、発光活性を求めた。その結果、それぞれの存在比に対して直線関係で変化することが明らかとなった。これは、細胞内で異なる発現量を示した赤色、橙色及び緑色発光タンパク量を、カラーフィルターを挿入したルミノメータで定量化できることを示唆している。

実施例17

- 10 実施例15で決めた手順で存在比の異なる赤色、橙、緑色発光タンパクのうち1つの発光色酵素量を一定として、2つの異なる組成の酵素を定量できるかをモデル実験で検証した。図22(A)は赤色発光タンパクを一定として、橙色、緑色発光タンパクについて、(B)は橙色発光タンパクを一定として、緑色、赤色発光タンパクについて、そして(C)は緑色発光タンパクを一定として、橙色、赤色発光タンパクについて、それぞれ存在比を変えたサンプルについて1)全発光量の測定、2)
- 15 設定したフィルターを用いて測定、換算し、発光活性を求めた。その結果、それぞれの存在比に対して直線関係で変化することが明らかとなった。これは、細胞内で異なる発現量を示した赤色、橙色及び緑色発光タンパク量を、カラーフィルターを挿入したルミノメータで定量化できることを示唆している。よって、一つの基質であっても、3つの発光色をもつ発光タンパクの定量は可能であり、3つの遺伝子の転写活性量が測定できることが明らかとなった。
- 20 なお、図11中の[A]、[B]、図12中の[C]は、以下のことを示す。

[A]:例えば、この一次スクリーニングでは赤色発光タンパクがコントロールとなり、青色は毒性を感じ、緑色は薬剤の効果を感じる。よって、A1カラムの薬剤は疾患に効果があるが、致死的に働く、A2カラムの薬剤はA1に比べてほぼ同様な効果があり、且つA1に比べて安全であると評価できる。

[B]:例えば、この一次スクリーニングでは赤色発光タンパクがコントロールとなり、緑色発光タンパク

- 25 には、プロモーター配列ライブラリーから得られた未知機能のプロモーターの活性をレポートする、偽プロモーター配列を青色発光タンパクに挿入、非特異的な効果を評価する。プロモーターターゲットが定まらない薬剤のターゲット部位をスクリーニングする。よって、ある薬剤に対してA1カラムの選択プロモーターでは一見効果があるが、青色で判断すると非特異的な可能性がある、A2カラムではA1と同様な効果があり、且つ青色で判断する限り非特異的ではない。

- 30 [C]:例えば、二次スクリーニングでは対象疾患に対して効果のある薬剤が、患者に対して有効に働くか、或いは何時投与することが重要であるかを評価できる。青色発光タンパクは人の体内時計の日周を現すプロモーターで最大値は昼間12時に対応、緑色発光タンパクは薬剤の一過的な影響を、赤色発光タンパクは薬剤が最終的に働くプロモーター領域を想定する。青色の朝6時に薬剤を投与すると、そのショックで1時間後に薬剤に対する影響を示す緑色が一過的に立ち上がる
- 35 が、その影響は数時間で消え、お昼ぐらいから薬剤の効果が緩やかに立ち上がることがわかる。この結果から、投与時間の設計、薬剤の影響と効果を適切なものにする創薬が可能となる。

請求の範囲

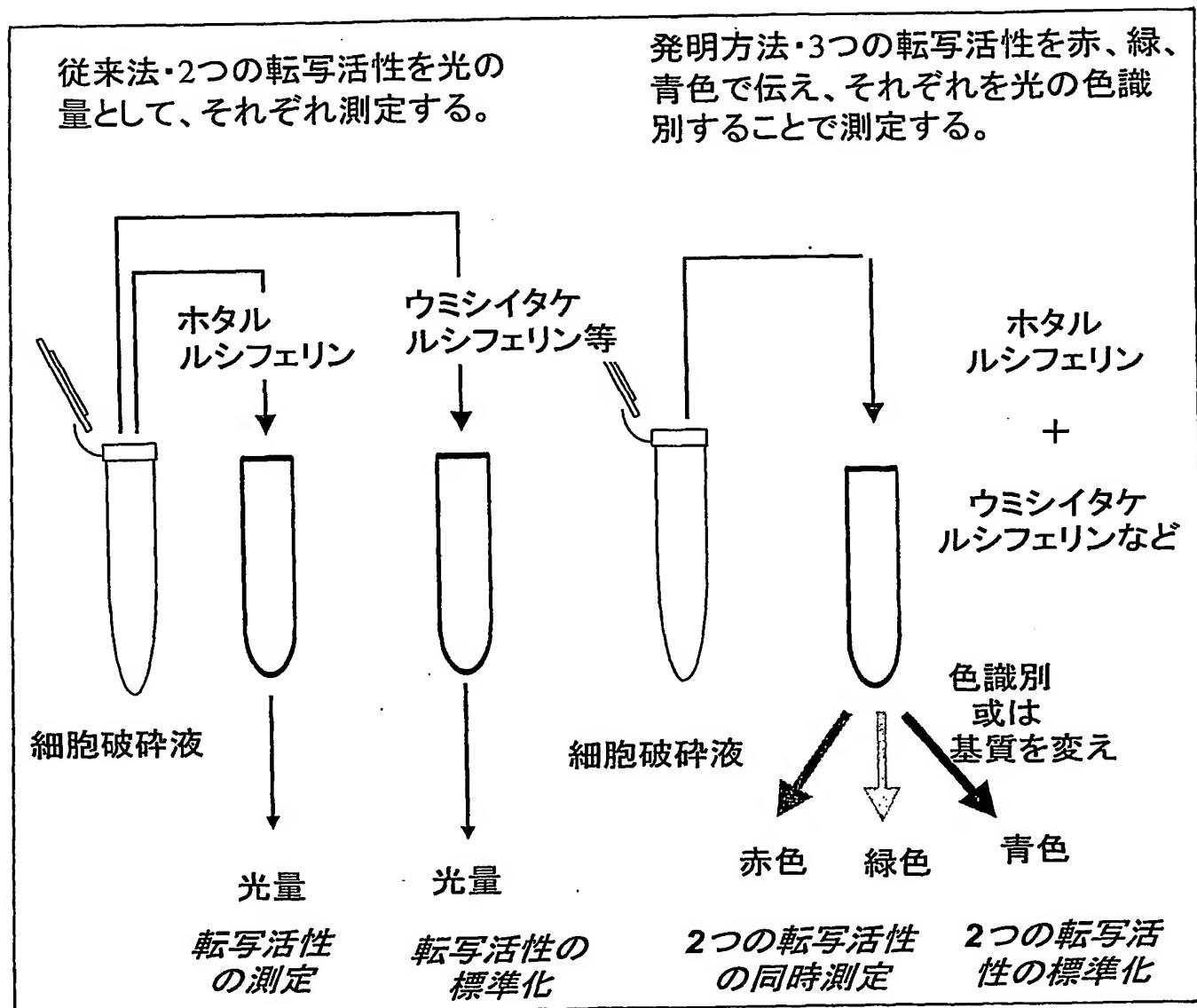
1. 哺乳類細胞安定発現化された鉄道虫由来赤色及び緑色発光タンパク、並びにイリオモテボタル由来の緑色及び橙色発光タンパクからなる群から選ばれる少なくとも1種の発光タンパクをコードするDNAであって、該DNAは、a) 哺乳類細胞の余分な転写因子5の結合配列がなく、哺乳類用のコドンユーセージを有することを特徴とするDNA.
2. 哺乳類がヒトであり、配列番号7、10、11及び16からなる群から選ばれる少なくとも1種のヌクレオチド配列を有することを特徴とする請求項1に記載のDNA。
3. 鉄道虫またはイリオモテボタル由来発光タンパクをコードするDNAの哺乳類における発現を可能にする方法であって、
10 a) 余分な転写因子が結合しないように、cDNAの配列を変更する工程
b) cDNAの配列において、昆虫のコドンユーセージを哺乳類用に変更する工程、さらに任意に
c) 使用上、制限酵素部位が多いことで応用が限定されることからそのcDNAを変更する工程
- 15 を有することを特徴とする方法。
4. 発光タンパクのアミノ酸配列を変更しないことを特徴とする請求項3に記載の方法。
5. 最大発光波長が630nmである発光タンパクであって、以下のいずれかで表されるポリペプチド：
 - (i) 配列番号4のアミノ酸配列を有するポリペプチド
- 20 (ii) 配列番号4の配列において、1または複数個のアミノ酸が置換、付加、欠失してなるポリペプチド
6. 哺乳類細胞で発現されてなる請求項5に記載のポリペプチド。
7. 最大発光波長が535～635nmであって、発光波長が測定条件に実質的に依存しない光を発光する1または2以上の発光タンパク遺伝子を哺乳類細胞で安定発現可能な
25 ように組み込んでなる遺伝子構築物。
8. 最大発光波長が535～635nmであって、発光波長が測定条件に実質的に依存しない光を発光する1または2以上の発光タンパク遺伝子とともに最大発光波長が460～520nmの1または2以上の発光タンパク遺伝子を組み込んでなる、3以上の発光タンパク遺伝子を哺乳類細胞で安定発現可能である請求項7に記載の遺伝子構築物。

9. 前記発光タンパク遺伝子が、哺乳類細胞で安定発現化された鉄道虫由来赤色、緑色発光タンパクおよびイリオモテボタル由来の緑色、橙色発光タンパクからなる群から選ばれる少なくとも1種の発光タンパクをコードする遺伝子である請求項7に記載の遺伝子構築物。
- 5 10. 翻訳を効率化するエレメント及び／又はmRNAの安定化エレメントを含む請求項7に記載の遺伝子構築物。
11. 発光波長が測定条件に実質的に依存しない光を発光する1または2以上の発光タンパク遺伝子と、必要に応じて発光波長が測定条件に実質的に依存しない他の発光波長の光を発光する発光タンパク遺伝子を各々別個のプロモータの制御下に組み込んで
10 なり、2種以上の発光タンパクによる各発光を分別して測定可能である遺伝子構築物。
12. 請求項7～11のいずれかに記載の遺伝子構築物を含む発現ベクター。
13. 請求項7～11のいずれかに記載の遺伝子構築物または請求項8に記載の発現ベクターで形質転換された哺乳類細胞。
14. 発光波長が測定条件に実質的に依存しない相互に分別可能な光を発光する2以
15 上の発光タンパク遺伝子を別個のプロモータの制御下に哺乳類細胞で安定発現可能な
ように組み込んだ哺乳類細胞。
16. 2以上の前記発光タンパクは、最大発光波長が535～635nmであって、1つの発
光基質で発光可能である請求項13または14に記載の哺乳類細胞。
17. 鉄道虫由来赤色発光タンパク遺伝子を含み、さらに鉄道虫由来緑色発光タンパク
20 遺伝子、イリオモテボタル由来の緑色発光タンパク遺伝子及び橙色発光タンパク遺伝子
並びに青色発光タンパク遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも2種を各々別個のプロ
モータの制御下に含む請求項15に記載の哺乳類細胞。
18. 発光波長が測定条件に実質的に依存しない相互に分別可能な光を発光する3以
上の発光タンパク遺伝子を別個のプロモータの制御下に哺乳類細胞で安定発現可能な
25 ように組み込んでなる請求項14に記載の哺乳類細胞。
19. 別個のプロモータの制御下にある3以上の発光タンパク遺伝子を有し、第1の発光
タンパク遺伝子が定常発現プロモータの制御下にあり、第2の発光タンパク遺伝子が毒性評価
プロモータの制御下にあり、残りの1以上の発光タンパク遺伝子が評価対象のプロ
モータの制御下にある請求項14に記載の哺乳類細胞。

19. 別個のプロモータの制御下にある3以上の発光タンパク遺伝子を有し、第1の発光タンパク遺伝子が定常発現プロモータの制御下にあり、第2の発光タンパク遺伝子が偽プロモータの制御下にあり、残りの1以上の発光タンパク遺伝子が評価対象のプロモータの制御下にある請求項14に記載の哺乳類細胞。
- 5 20. 別個のプロモータの制御下にある4以上の発光タンパク遺伝子を有し、第1の発光タンパク遺伝子が定常発現プロモータの制御下にあり、第2の発光タンパク遺伝子が毒性評価プロモータの制御下にあり、第3の発光タンパク質が外的因子を受容するタンパクのプロモータであり、残りの1以上の発光タンパク遺伝子が評価対象のプロモータの制御下にある請求項14に記載の哺乳類細胞。
- 10 21. 別個のプロモータの制御下にある4以上の発光タンパク遺伝子を有し、第1の発光タンパク遺伝子が定常発現プロモータの制御下にあり、第2の発光タンパク遺伝子が偽プロモータの制御下にあり、第3の発光タンパク質が外的因子を受容するタンパクのプロモータであり、残りの1以上の発光タンパク遺伝子が評価対象のプロモータの制御下にある請求項14に記載の哺乳類細胞。
- 15 22. 別個のプロモータの制御下にある2個の前記発光タンパク遺伝子を有し、第1の発光タンパク遺伝子が定常発現プロモータの制御下にあり、第2の発光タンパク遺伝子が毒性評価プロモータの制御下にある請求項14に記載の哺乳類細胞。
23. 別個のプロモータの制御下にある2個の前記発光タンパク遺伝子を有し、第1の発光タンパク遺伝子が定常発現プロモータの制御下にあり、第2の発光タンパク遺伝子が偽プロモータの制御下にある請求項14に記載の哺乳類細胞。
- 20 24. 請求項18～21のいずれかに記載の哺乳類細胞の培養液中に薬物候補化合物を存在させて該哺乳類細胞を培養する工程、該候補化合物の存在下及び非存在下で前記発光タンパク量を定量する工程、少なくとも1つの発光タンパクに連結された少なくとも1つの評価対象プロモータに対する該候補化合物の影響を評価する工程を包含する薬物のスクリーニング方法。
25. 請求項13～23のいずれかの哺乳類細胞の培養環境を変化させて、発光波長が測定条件に依存しない相互に分別可能な光を発光する2以上の発光タンパクの発現量を評価することにより、培養環境変化の前後における各発光タンパクに結合された各プロモータの転写活性をマルチに測定するシステム。

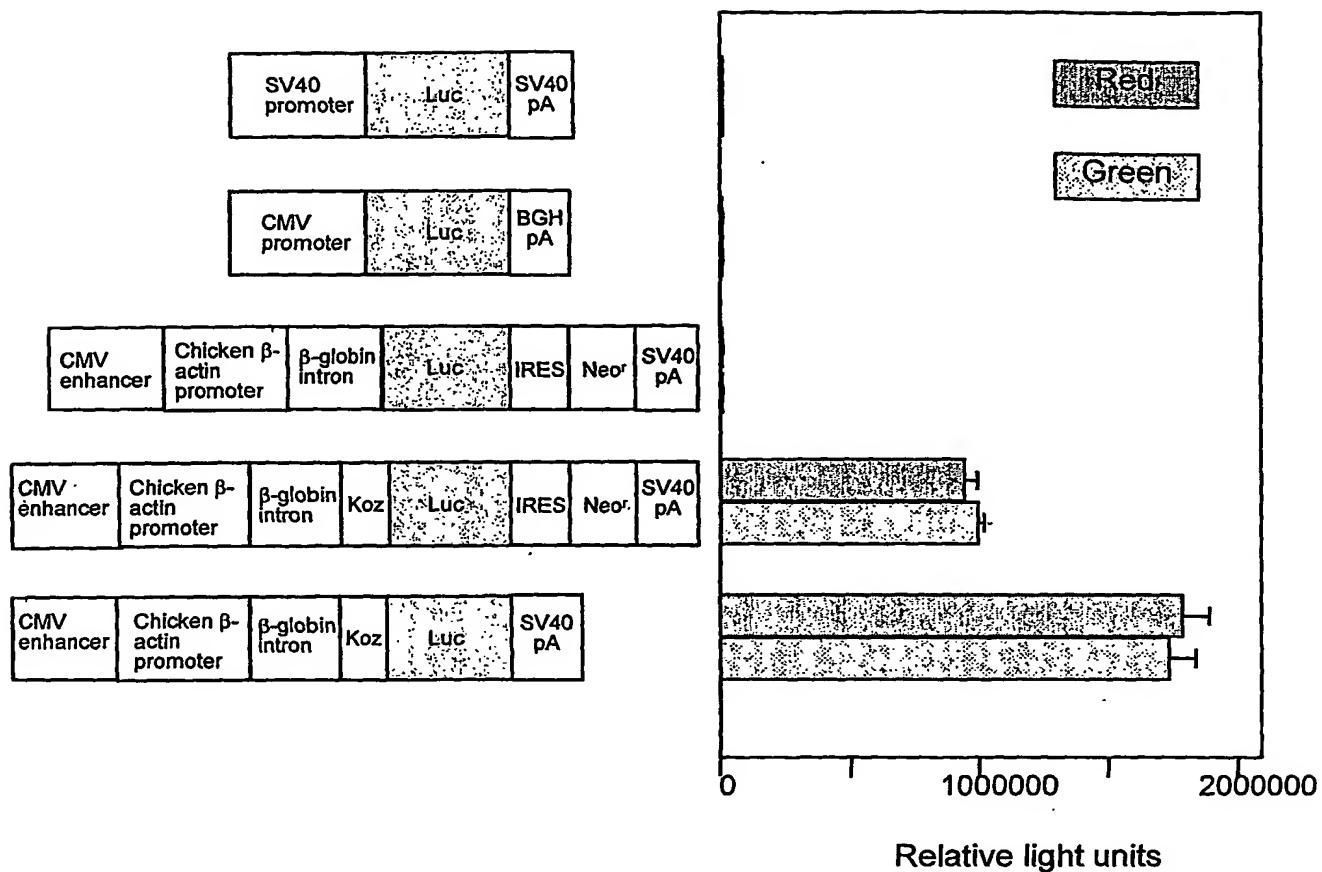
26. 2以上の発光タンパクの発現量を同時に測定する請求項23に記載のシステム。
27. 3以上の発光タンパクの発現量を測定可能である請求項23に記載のシステム。

1 / 22
Fig. 1

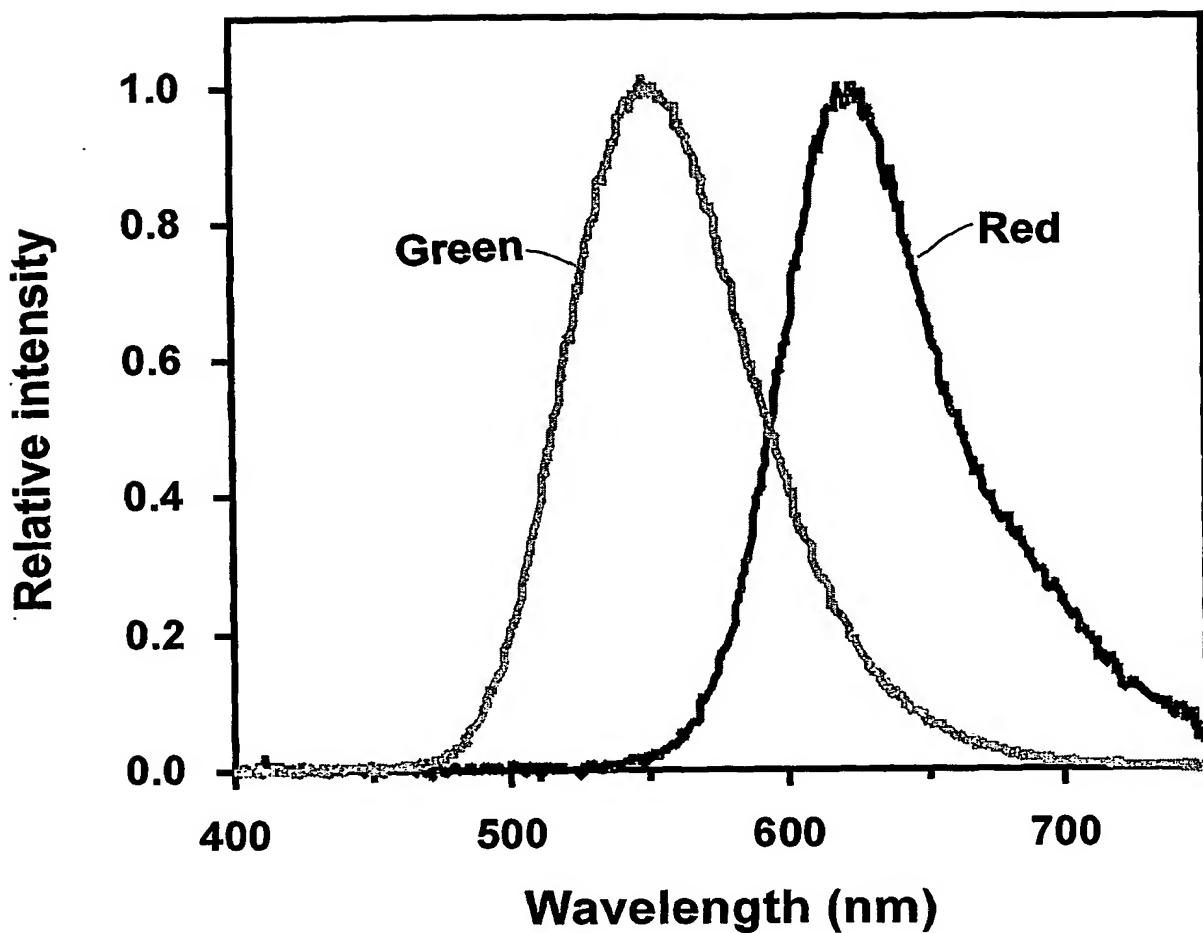


2 / 22

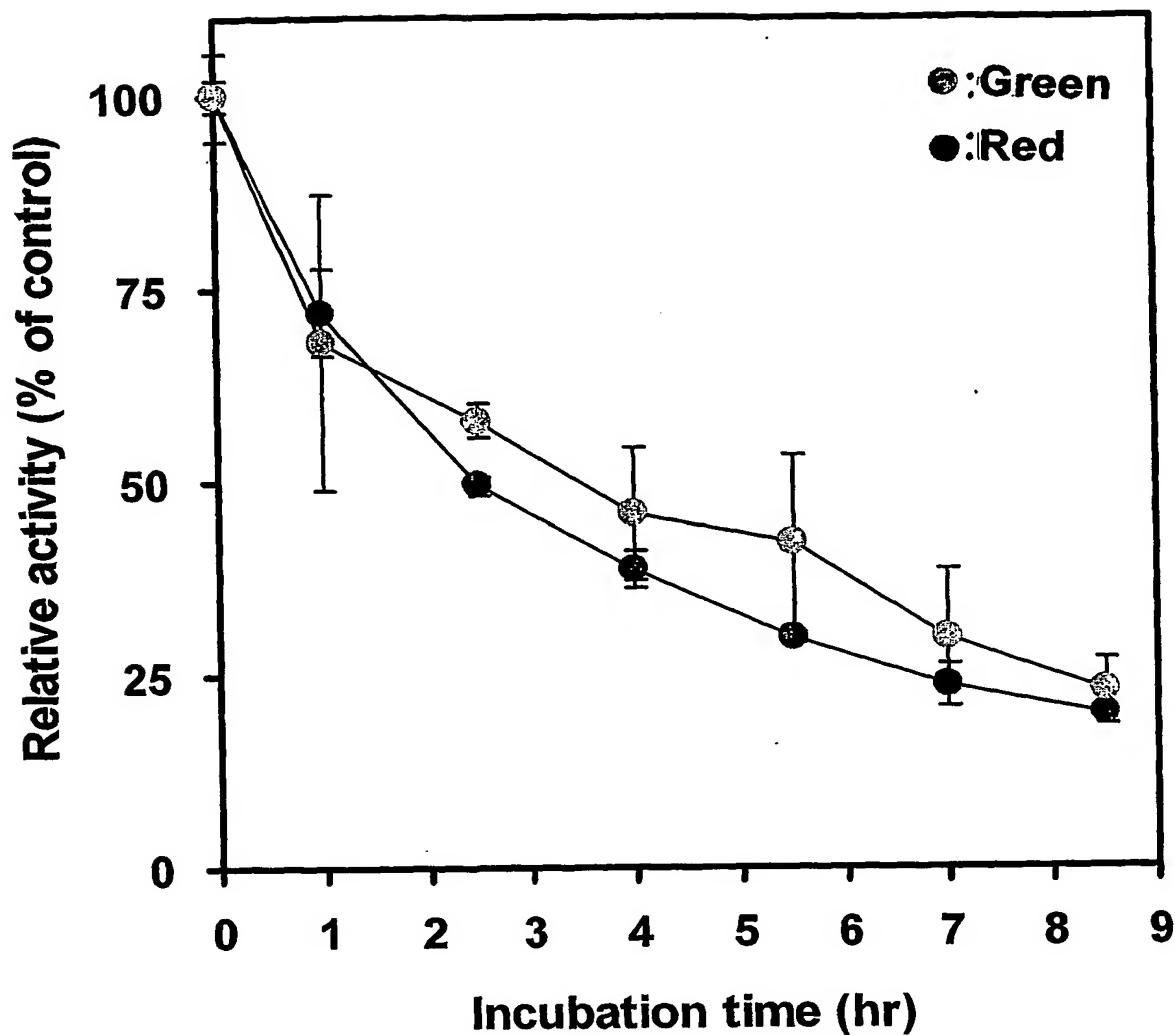
Fig. 2



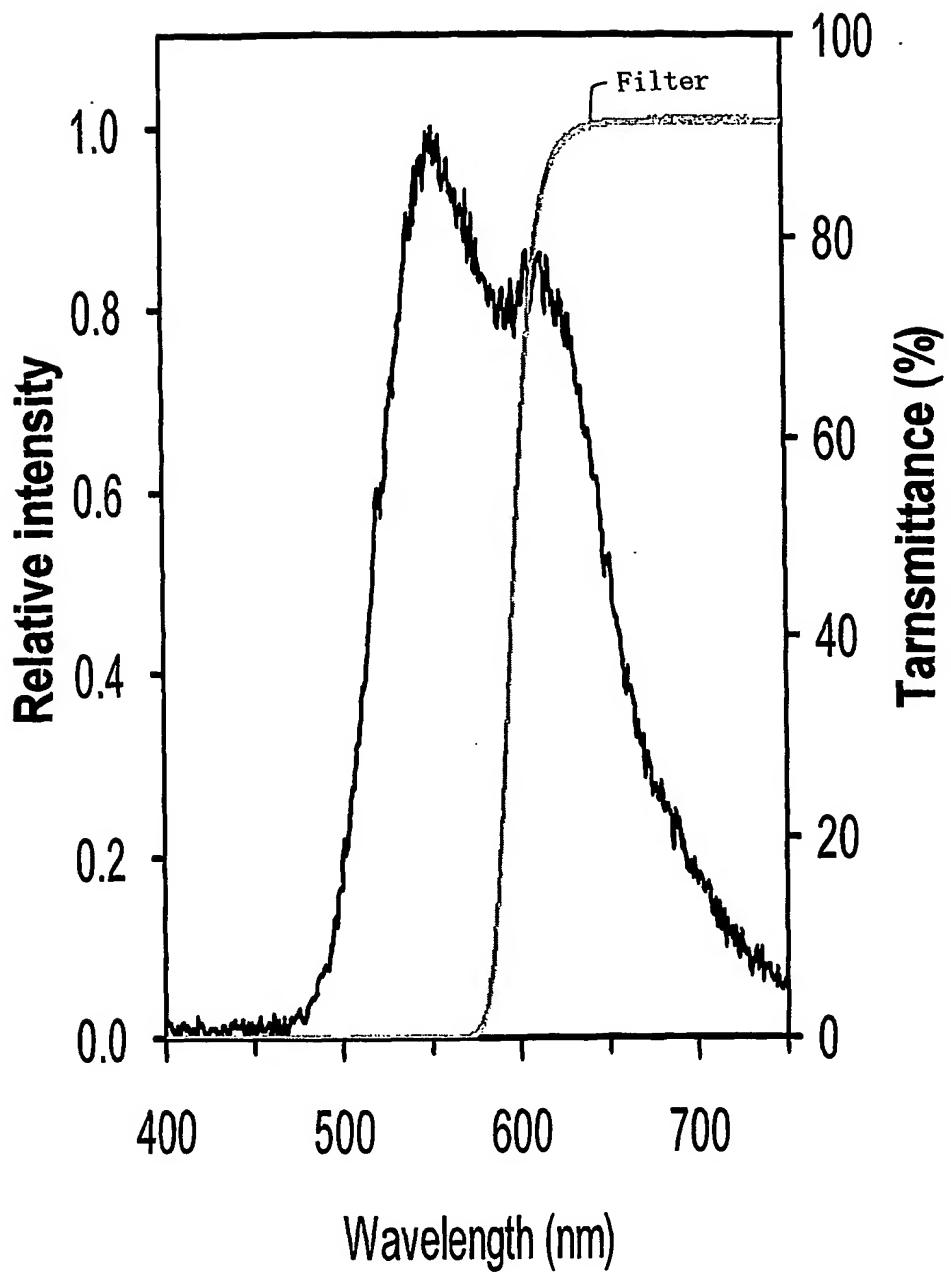
3 / 2 2
Fig. 3



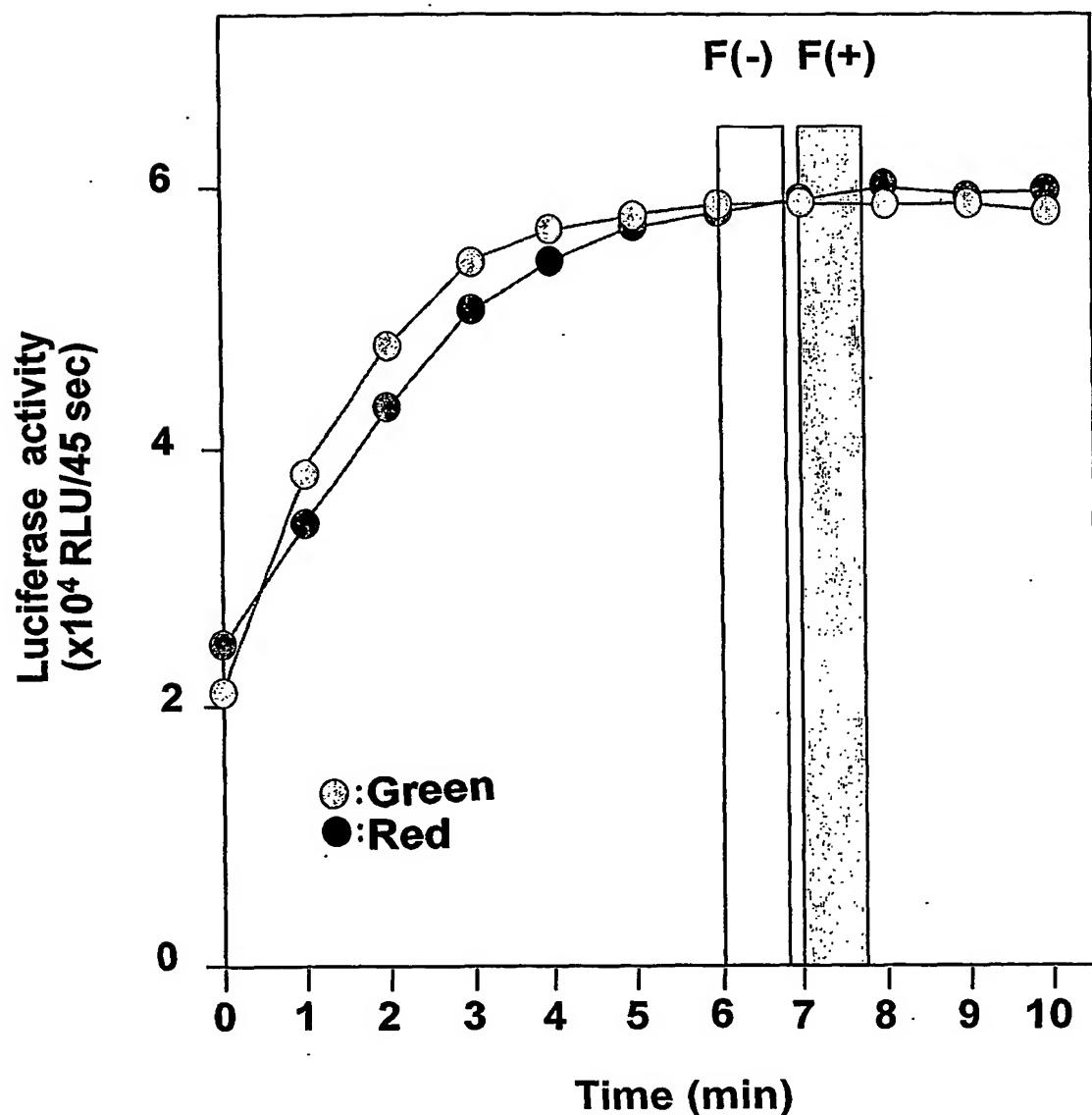
4 / 2 2
Fig. 4



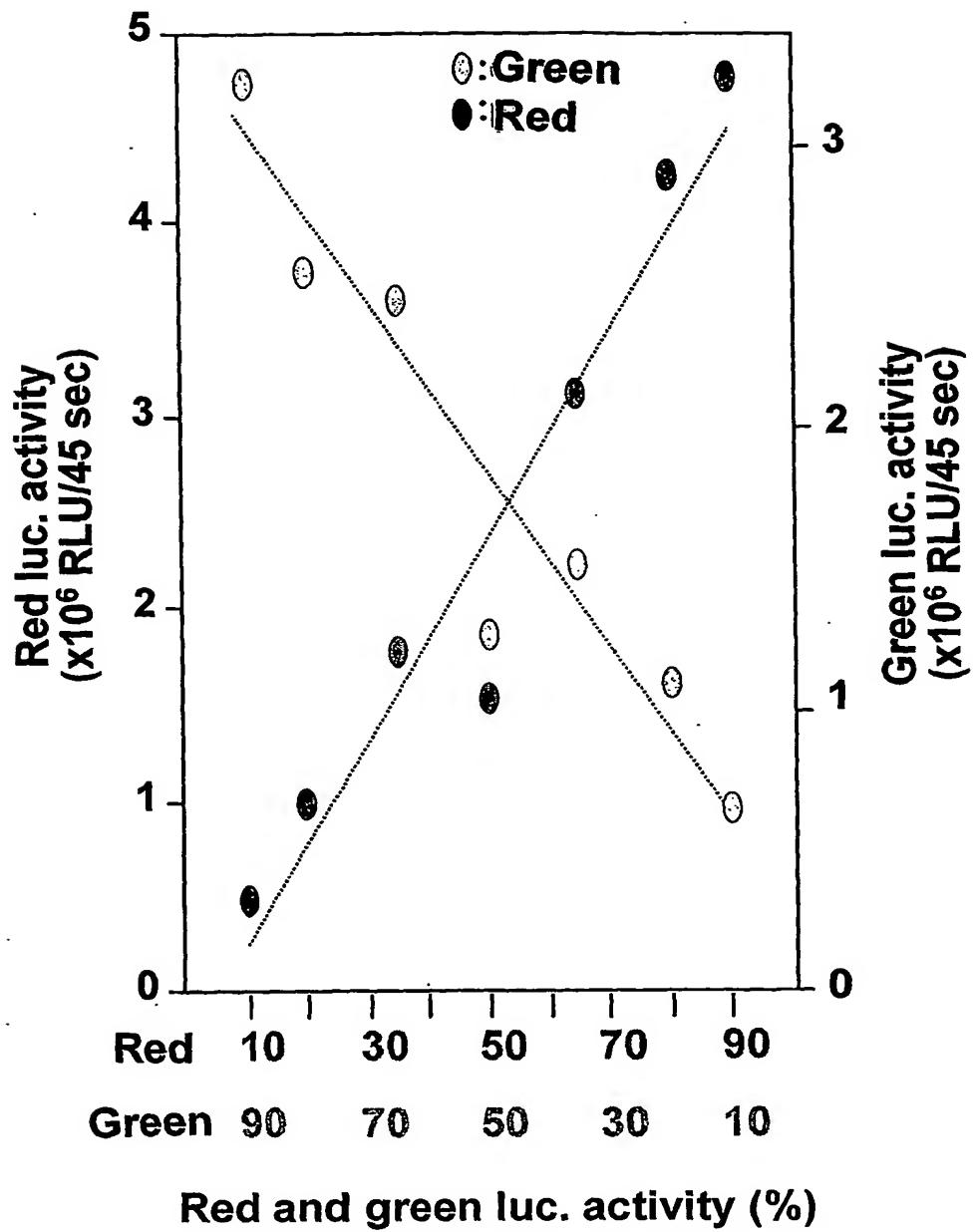
5 / 2 2
Fig. 5



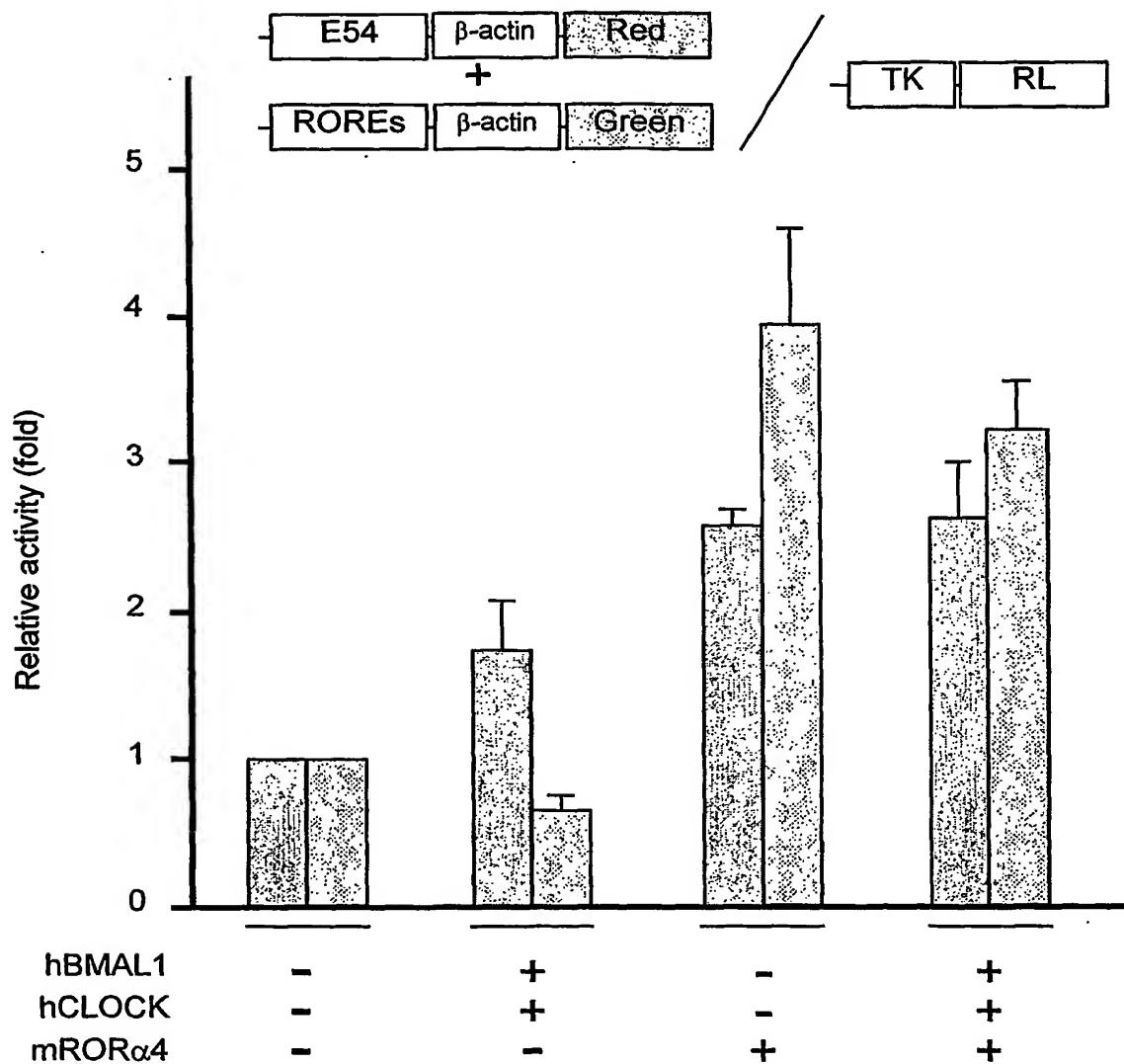
6 / 2 2
Fig. 6



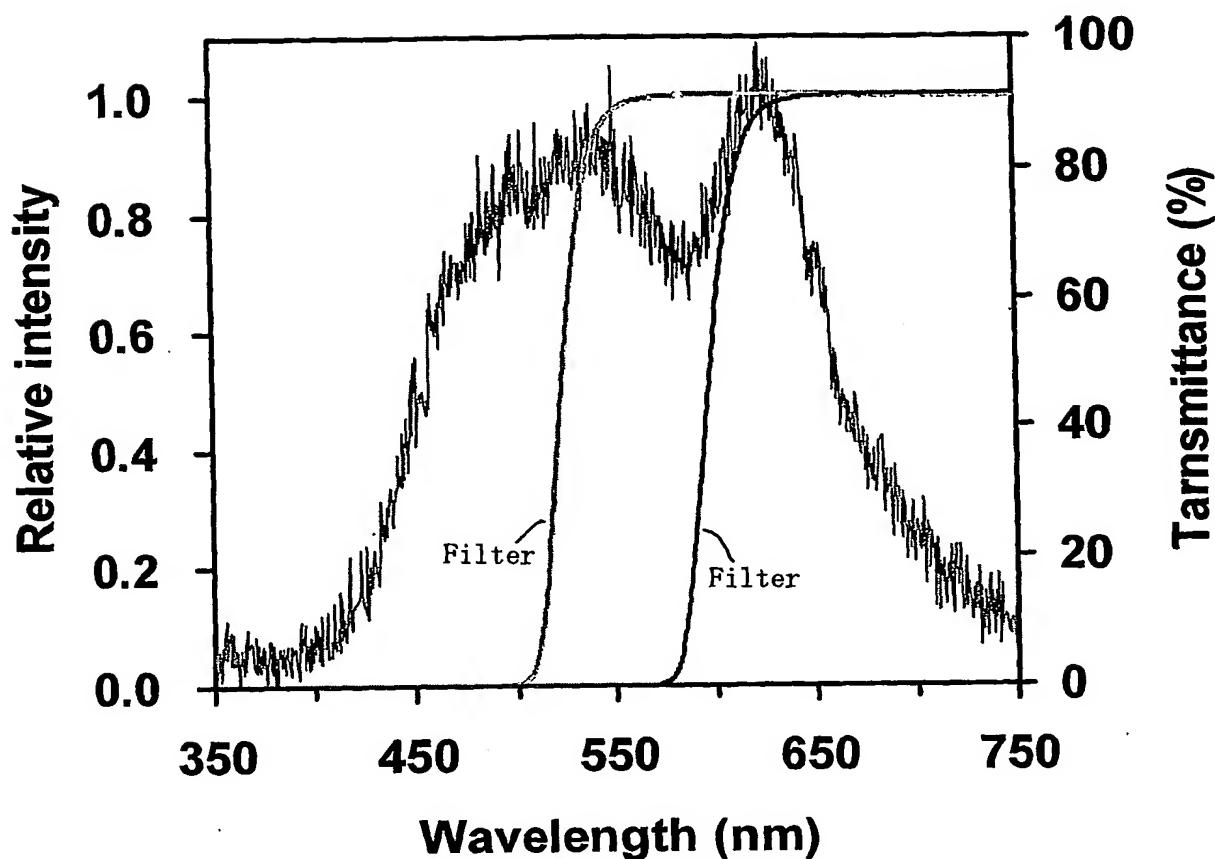
7 / 22
Fig. 7



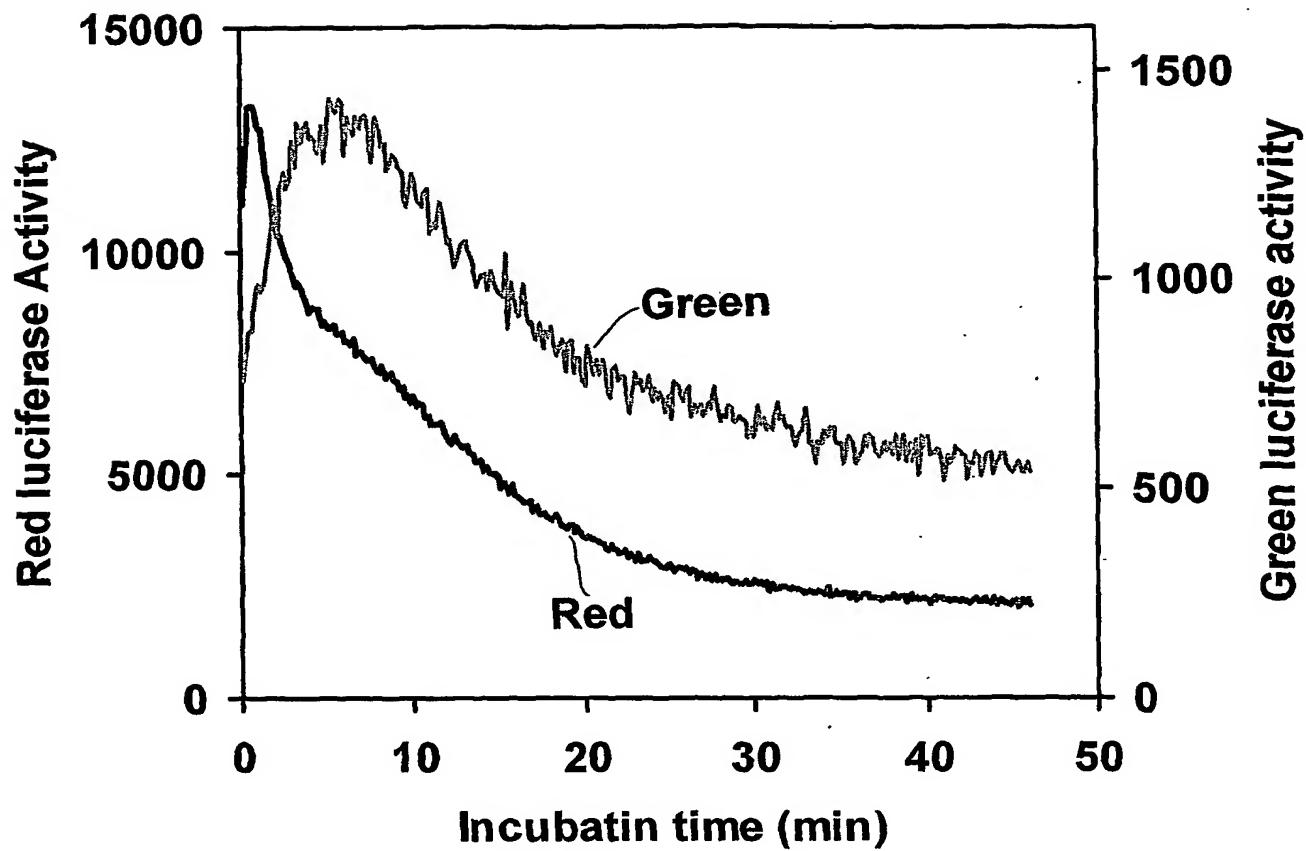
8 / 2 2
Fig. 8



9 / 22
Fig. 9



10 / 22
Fig. 10

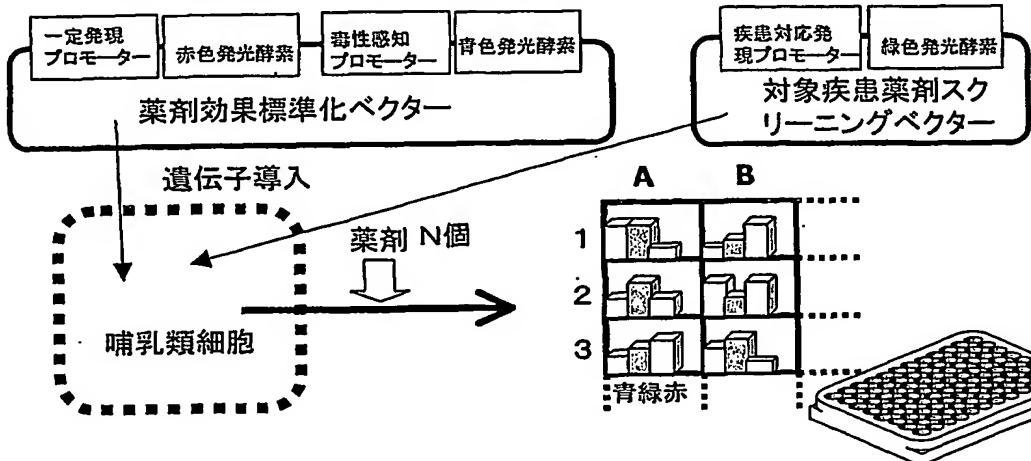


11/22

Fig. 11

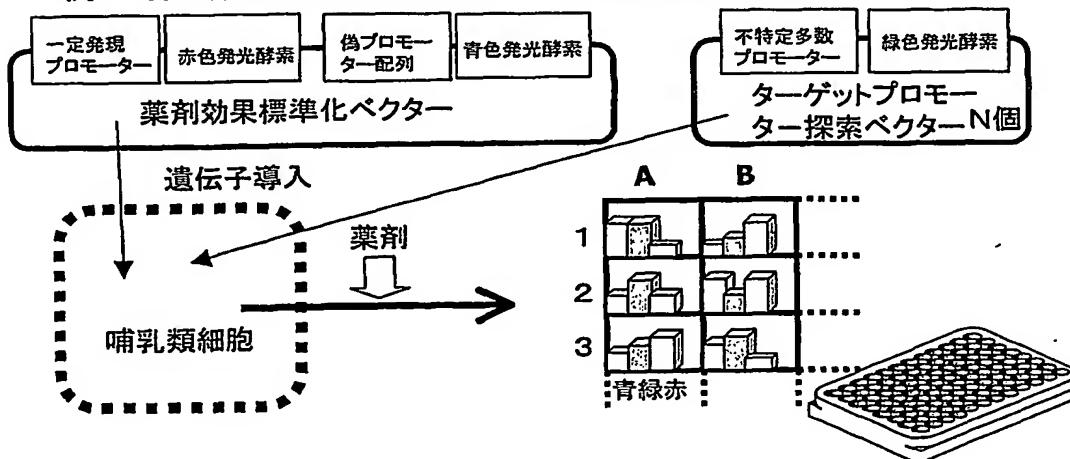
一次スクリーニングで多検体を網羅解析する

例1 疾患対応遺伝子発現を誘導する薬剤のスクリーニング



例えば、この一次スクリーニングでは赤色発光酵素がコントロールとなり、青色は毒性を感じ、緑色は薬剤の効果を感じる。よって、A1カラムの薬剤は疾患に効果があるが、致死的に働く、A2カラムの薬剤はA1に比べてほぼ同様な効果があり、且つA1に比べて安全であると評価できる。

例2 ある薬剤が効果を及ぼす遺伝子発現領域のスクリーニング

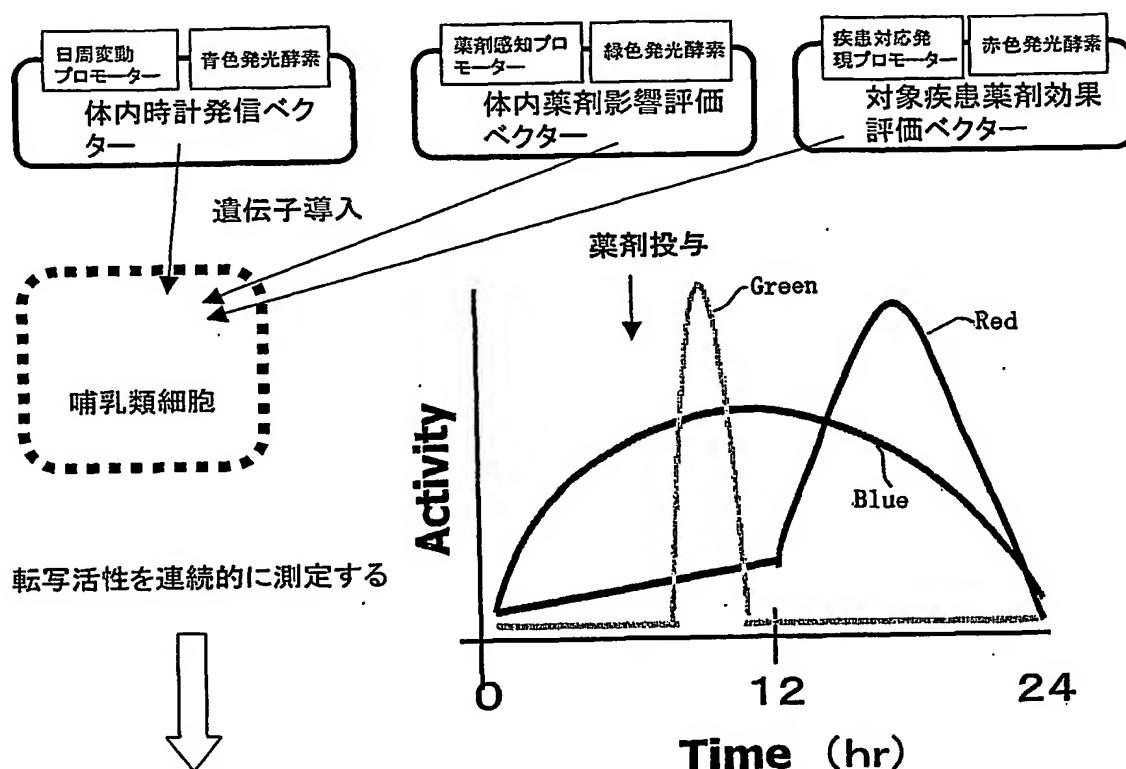


例えば、この一次スクリーニングでは赤色発光酵素がコントロールとなり、緑色発光酵素には、プロモーター配列ライブラリーから得られた未知機能のプロモーターの活性をレポートする、偽プロモーター配列を青色酵素に挿入、非特異的な効果を評価する。プロモーターターゲットが定まらない薬剤のターゲット部位をスクリーニングする。よって、ある薬剤に対してA1カラムの選択プロモーターでは一見効果があるが、青色で判断すると非特異的な可能性がある、A2カラムではA1と同様な効果があり、且つ青色で判断する限り非特異的ではない。

12 / 22
Fig. 12

二次スクリーニングでは個別事象を評価する

例 身体の日周変動を理解した上での創薬



例えば、二次スクリーニングでは対象疾患に対して効果のある薬剤が、患者に対して有効に働くか、或いは何時投与することが重要であるかを評価できる。青色発光酵素は人の体内時計の日周を現すプロモーターで最大値は昼間12時に対応、緑色発光酵素は薬剤の一過的な影響を、赤色発光酵素は薬剤が最終的に働くプロモーター領域を想定する。青色の朝6時に薬剤を投与すると、そのショックで1時間後に薬剤に対する影響を示す緑色が一過的に立ち上がるが、その影響は数時間で消え、お昼ぐらいから薬剤の効果が緩やかに立ち上がることがわかる。この結果から、投与時間の設計、薬剤の影響と効果を適切なものにする創薬が可能となる。

13 / 22

Fig. 13

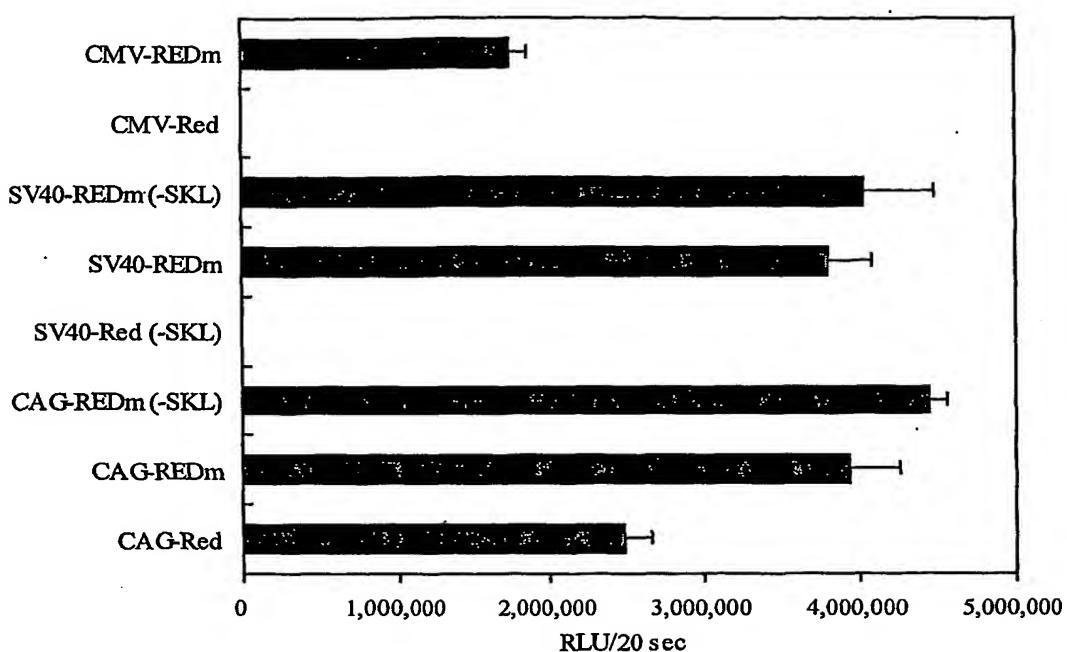
RedWT	1	ATGGAAGAAGAAACATATGTAGTGGGATCGCCTCGGATCTACTTTTCCTGGCAC	60
REDm	1	ATGGAAGAAGAAACATATGTAGTGGGATCGCCTCGGATCTACTTTTCCTGGCAC	60
RedWT	61	GCAGGACTACAAATTATCACTCATATAATAATATCTATTTTGACGGAAATATTC	120
REDm	61	GCAGGACTACAAATTATCACTCATATAATAATATCTATTTTGACGGAAATATTC	120
RedWT	121	GAGGCCATACCAATGAACTATATCAATATGCCTAACATTATTTTGAAACAGCTGGCGCTTG	180
REDm	121	GAGGCCATACCAATGAACTATATCAATATGCCTAACATTATTTTGAAACAGCTGGCGCTTG	180
RedWT	181	GGCGTGAAGCTGAAATAATGGATCAACACAGTTGGCAATATGGCAGATATGCA	240
REDm	181	GGCGTGAAGCTGAAATAATGGATCAACACAGTTGGCAATATGGCAGATATGCA	240
RedWT	241	AACAACATACACTTTCGGCCATTATCTGTTATACCAACGGATTCACATGGCA	300
REDm	241	AACAACATACACTTTCGGCCATTATCTGTTATACCAACGGATTCACATGGCA	300
RedWT	301	ACATCAATGATATGTACACAGAGGGAGATGATGGCAATTGGAAATATGCAACATGGCA	360
REDm	301	ACATCAATGATATGTACACAGAGGGAGATGATGGCAATTGGAAATATGCAACATGGCA	360
RedWT	361	TGCTTATGTTTGGTCAAGAAATFACTCTCATTTATCTGAAAGTCAAAACACATA	420
REDm	361	TGCTTATGTTTGGTCAAGAAATFACTCTCATTTATCTGAAAGTCAAAACACATA	420
RedWT	421	GAACTTCTTAAACAAAGGAAATCTTATGAAAGTATGTACCAAATGGCTTGAATGCG	480
REDm	421	GAACTTCTTAAACAAAGGAAATCTTATGAAAGTATGTACCAAATGGCTTGAATGCG	480
RedWT	481	GTATTTAGCTTGTCTGAGTACATCACGGCTTATCTTCAAGTGTAAACCTTACCCA	540
REDm	481	GTATTTAGCTTGTCTGAGTACATCACGGCTTATCTTCAAGTGTAAACCTTACCCA	540
RedWT	541	AAAGAGTTTGATCCCCCTGGAAAGAACCGCAATTATGACATCTCTGGACARACGGCA	600
REDm	541	AAAGAGTTTGATCCCCCTGGAAAGAACCGCAATTATGACATCTCTGGACACAAACGGCA	600
RedWT	601	TGGCTTAACGGGTAATATAGCCATAGAGATAACATAAGATTGGCCATAGCAG	660
REDm	601	TGGCTTAACGGGTAATATAGCCATAGAGATAACATAAGATTGGCCATAGCAG	660
RedWT	661	SATCCCACATCTAAGGAAACGGCAATTCTGAGTACATCAATCTCTGGACACCGTT	720
REDm	661	SATCCCACATCTAAGGAAACGGCAATTCTGAGTACATCAATCTCTGGACACCGTT	720
RedWT	721	CACACGCCCTTGGACTGTTAACGCTTACTTCCAGTGGCTTACTTCCAGTGGCTGAGATGCA	780
REDm	721	CACACGCCCTTGGACTGTTAACGCTTACTTCCAGTGGCTTACTTCCAGTGGCTGAGATGCA	780
RedWT	781	ATGGTGAAAGATTGGAGGGCAATTCTTCAATATGCACTTACAAATTCGCT	840
REDm	781	ATGGTGAAAGATTGGAGGGCAATTCTTCAATATGCACTTACAAATTCGCT	840
RedWT	841	FCTATCTGATCCCTCCAAATATGGTATATGGCAAAAGCTTACATGATTCGCT	900
REDm	841	FCTATCTGATCCCTCCAAATATGGTATATGGCAAAAGCTTACATGATTCGCT	900
RedWT	901	TACAATCTGCTAGCTTACGAAATTGCGTGGGAGGCTTCTTCAAGGAGAGATATC	960
REDm	901	TACAATCTGCTAGCTTACGAAATTGCGTGGGAGGCTTCTTCAAGGAGAGATATC	960
RedWT	961	GGAGAATGAGGAGGAGATGAAATGAGGATCTGAGGATATGGATTAACCC	1020
REDm	961	GGAGAATGAGGAGGAGATGAAATGAGGATCTGAGGATATGGATTAACCC	1020
RedWT	1021	GAACCTCTGGCCCTATGTTAAAGTTATGAGATACTTACAGGAGGGCTTA	1080
REDm	1021	GAACCTCTGGCCCTATGTTAAAGTTATGAGATACTTACAGGAGGGCTTA	1080
RedWT	1081	GGACCCCTATGCCATATGTTAAAGTTATGAGATACTTACAGGAGGGCTTA	1140
REDm	1081	GGACCCCTATGCCATATGTTAAAGTTATGAGATACTTACAGGAGGGCTTA	1140
RedWT	1141	GGACCAAGAGAAATAGGGCAATTGCTTCAAACTTACATGCTTATGAAAGGATACAC	1200
REDm	1141	GGACCAAGAGAAATAGGGCAATTGCTTCAAACTTACATGCTTATGAAAGGATACAC	1200
RedWT	1201	ACACACCCACAGGCCACCAGGATGCGCTTACACAAAGGAGGGGTGCTGCAACGGGAT	1260
REDm	1201	ACACACCCACAGGCCACCAGGATGCGCTTACACAAAGGAGGGGTGCTGCAACGGGAT	1260
RedWT	1261	CTGGGATATACGACGGAATACAGATTATCTATGTTGCTGATGAAAGAACTTATC	1320
REDm	1261	CTGGGATATACGACGGAATACAGATTATCTATGTTGCTGATGAAAGAACTTATC	1320
RedWT	1321	AAATATAAGGAAATACAGGTTGGCCCTGCTGACTGGAAATTCTGCTTAACTACCA	1380
REDm	1321	AAATATAAGGAAATACAGGTTGGCCCTGCTGACTGGAAATTCTGCTTAACTACCA	1380
RedWT	1381	ATATATCTGATGGGGTTATGGGATTCGGACGAAATTGGCTTAACTTC	1440
REDm	1381	ATATATCTGATGGGGTTATGGGATTCGGACGAAATTGGCTTAACTTC	1440
RedWT	1441	GGCTGTGTGTTGTTGGCTGGAGACATGACCGGAAAGGAAATTCTGAGGATTATATC	1500
REDm	1441	GGCTGTGTGTTGTTGGCTGGAGACATGACCGGAAAGGAAATTCTGAGGATTATATC	1500
RedWT	1501	GGAGACTTACATACACAACTTCTGGGGCTTCTTATGAAAGGATTCACAGCATT	1560
REDm	1501	GGAGACTTACATACACAACTTCTGGGGCTTCTTATGAAAGGATTCACAGCATT	1560
RedWT	1561	CCAAAAGGCCAACAGGAATTGAGAAAACGGAATTCTGCTTAACTTGGCCGGAG	1620
REDm	1561	CCAAAAGGCCAACAGGAATTGAGAAAACGGAATTCTGCTTAACTTGGCCGGAG	1620
RedWT	1621	CAGGCGATATGAAATTAACG	1641
REDm	1621	CAGGCGATATGAAATTAACG	1641

14 / 22

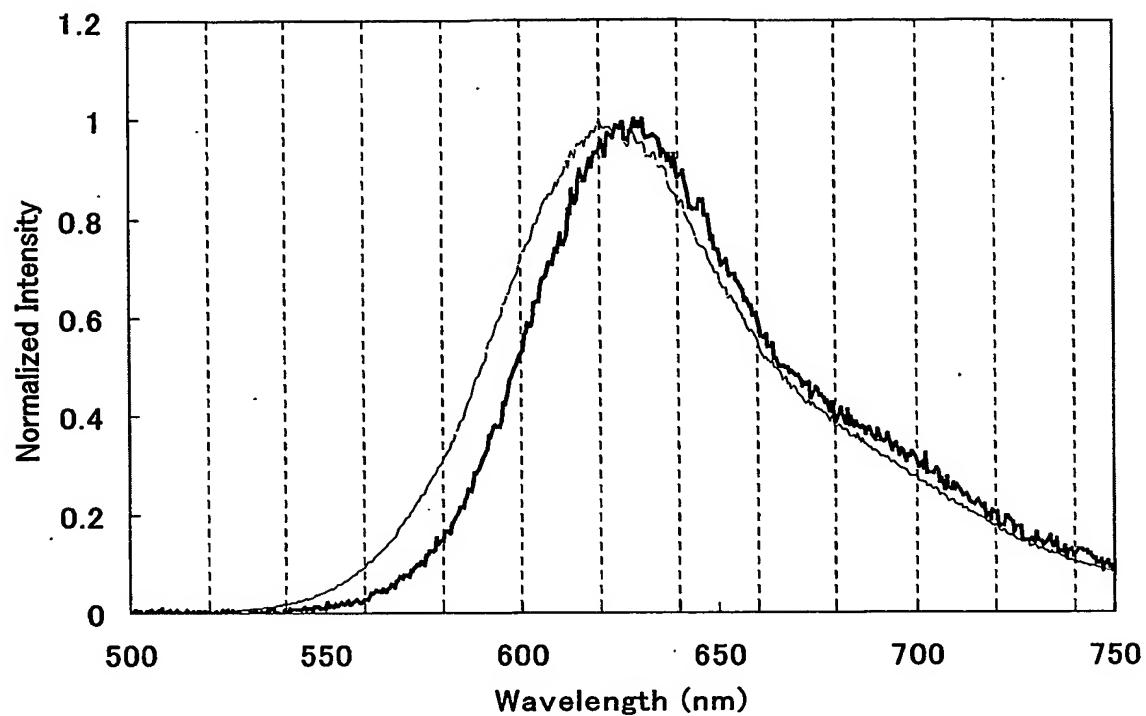
Fig. 14

REDm WO2003-016839	1	ATGGAAGAAGAACATACAGTGAATGGCAGTCGCCCTGGATCTGGTGTTCCGGCACAA	60
REDm WO2003-016839	1	ATGGAAGAAGAACATACAGTGAATGGCAGTCGCCCTGGATCTGGTGTTCCGGCACAA	60
REDm WO2003-016839	61	GCGGCCCTCAGCTGTACAGTCCTGTATAAATAATCTTACATCACGCGAACATATC	120
REDm WO2003-016839	61	GCGGCCCTCAGCTGTACAGTCCTGTATAAATAATCTTACATCACGCGAACATATC	120
REDm WO2003-016839	121	SACGCCCAATCCACGAGGTGATCTCATATGCACAGATTTGAAACCTCCGGCTG	180
REDm WO2003-016839	121	SACGCCCAATCCACGAGGTGATCTCATATGCACAGATTTGAAACCTCCGGCTG	180
REDm WO2003-016839	181	GCGGTGAGCTGGAGAAGTATGGCTGGATCACACAACTGGTGGCCATTCGAGGCA	240
REDm WO2003-016839	181	GCGGTGAGCTGGAGAAGTATGGCTGGATCACACAACTGGTGGCCATTCGAGGCA	240
REDm WO2003-016839	241	AACAAACATCACTTCTCGGCCCTGATGCTGCCCTATACCAACGGATTCACATGGC	300
REDm WO2003-016839	241	AACAAACATCACTTCTCGGCCCTGATGCTGCCCTSPACCAACGGATTCACATGGC	300
REDm WO2003-016839	301	ACATCACACGATGTACACGGAGGGAGATGATGGCCACTGAAACATCTCAAGCCA	360
REDm WO2003-016839	301	ACATCACACGATGTACACGGAGGGAGATGATGGCCACTGAAACATCTCAAGCCA	360
REDm WO2003-016839	361	TGCTGATGTTCTGTTCTAGAAATCTCGGCCCTCATCTGAAAGGTGCAGARGCACCTG	420
REDm WO2003-016839	361	TGCTGATGTTCTGTTCTAGAAATCTCGGCCCTCATCTGAAAGGTGCAGARGCACCTG	420
REDm WO2003-016839	421	GACTTTCTCTAGAATCTATGTTCTAGCATGTACGATTCATGGCTGGAGTGC	480
REDm WO2003-016839	421	GACTTTCTCTAGAATCTATGTTCTAGCATGTACGATTCATGGCTGGAGTGC	480
REDm WO2003-016839	481	GTTTCAGTTCTGCTGCCGGTACACGATCAGCAGCTTCGAGCCAGTGAAGTTCAACCC	540
REDm WO2003-016839	481	GTTTCAGTTCTGCTGCCGGTACACGATCAGCAGCTTCGAGCCAGTGAAGTTCAACCC	540
REDm WO2003-016839	541	AAAGAGTTGAGCTCCCTGAGAGAACCGCCTGATCATGACATCTCTGGAACACGG	600
REDm WO2003-016839	541	AAAGAGTTGAGCTCCCTGAGAGAACCGCCTGATCATGACATCTCTGGAACACGG	600
REDm WO2003-016839	601	CTGCCCTAAGGGCTCTGATCACACAGAGCATACATCAGATTCTGTCACAGCAG	660
REDm WO2003-016839	601	CTGCCCTAAGGGCTCTGATCACACAGAGCATACATCAGATTCTGTCACAGCAG	660
REDm WO2003-016839	661	GATCCCACATCTACGGCACCGATCTCCCCAGAACATCATCTCTGGCATTCGAC	720
REDm WO2003-016839	661	GATCCCACATCTACGGCACCGATCTCCCCAGAACATCATCTCTGGCATTCGAC	720
REDm WO2003-016839	721	CACACGCCCTTGGACTGTTACCGCTGGCTTACTTCCATCTGAGCTGAAAGATGTC	780
REDm WO2003-016839	721	CACACGCCCTTGGACTGTTACCGCTGGCTTACTTCCATCTGAGCTGAAAGATGTC	780
REDm WO2003-016839	781	ATGGTGAATAAGTTTGAGGGCGAGTTCTGAGAACCATCGAACTACAAAGATCGCT	840
REDm WO2003-016839	781	ATGGTGAATAAGTTTGAGGGCGAGTTCTGAGAACCATCGAACTACAAAGATCGCT	840
REDm WO2003-016839	841	TCTATCTGCTGCCCTCCATATGGTCTATCTGCTATGGTCTATCTGGCTAGTCCCGATGAA	900
REDm WO2003-016839	841	TCTATCTGCTGCCCTCCATATGGTCTATCTGGCTAGTCCCGATGAA	900
REDm WO2003-016839	901	TACAATCTCTCTGACAAATCGCCTGACGAAATCGCCTGAGGGCTCTCTGGAGAACATC	960
REDm WO2003-016839	901	TACAATCTCTCTGACGAAATCGCCTGACGAAATCGCCTGAGGGCTCTCTGGAGAACATC	960
REDm WO2003-016839	961	GCAGCAATGGCCAAGAGACTGAACTGACAGGCTTCTCTGAGGGATATGGCTGACC	1020
REDm WO2003-016839	961	GCAGCAATGGCCAAGAGACTGAACTGACAGGCTTCTCTGAGGGATATGGCTGACC	1020
REDm WO2003-016839	1021	GAGACCTGAGCCCTGATGCTGAGCCCTAACGATAGAGGCTGAAAGGGCGATC	1080
REDm WO2003-016839	1021	GAGACCTGAGCCCTAACGATGCTGAGCCCTAACGATGGGACTGAAAGGGCGATC	1080
REDm WO2003-016839	1081	GCGACCCCTATGCCCTATGTCCTGAGGGTGAATGACATCACACCCGAAAGCCCTG	1140
REDm WO2003-016839	1081	GCGACCCCTATGCCCTATGTCCTGAGGGTGAATGACATCACACCCGAAAGCCCTG	1140
REDm WO2003-016839	1141	GGACCAAGAGGAGATGGCGAGATGGCTTCAGAGCTAGATGCTGATGAAAGGGCTAC	1200
REDm WO2003-016839	1141	GGACCAAGAGGAGATGGCGAGATGGCTTCAGAGCTAGATGCTGATGAAAGGGCTAC	1200
REDm WO2003-016839	1201	ACAAATCTCAGGCCACAGGGATGCTGGACAAAGGAAGGGGGCTGCACACCGGAT	1260
REDm WO2003-016839	1201	ACAAATCTCAGGCCACAGGGATGCTGGACAAAGGAAGGGGGCTGCACACCGGAT	1260
REDm WO2003-016839	1261	CTGGGTAATACAGGACGAGACAGATTCTATGCTGGATCGGGCTGGCTGAAGAGGCTATC	1320
REDm WO2003-016839	1261	CTGGGTAATACAGGACGAGACAGATTCTATGCTGGATCGGGCTGGCTGAAGAGGCTATC	1320
REDm WO2003-016839	1321	AAGTACATCTGGCTACAGGTGGCCCTGGCAGACAGCTGCTGAGAACATCTGGCAGCACCC	1380
REDm WO2003-016839	1321	AAGTACATCTGGCTACAGGTGGCCCTGGCAGACAGCTGCTGAGAACATCTGGCAGCACCC	1380
REDm WO2003-016839	1381	AAATCTCTGATGCCGGCGTCTGGCTATGGAAATCTCCGACGATTCTGCTGCTGAACTACCTTCC	1440
REDm WO2003-016839	1381	AAATCTCTGATGCCGGCGTCTGGCTATGGAAATCTCCGACGATTCTGCTGCTGAACTACCTTCC	1440
REDm WO2003-016839	1441	GCCTGTCGTCGCTGGAGCCCTGGCAAGACATGACCCGAGAACATGTCAGGAACTAC	1500
REDm WO2003-016839	1441	GCCTGTCGTCGCTGGAGCCCTGGCAAGACATGACCCGAGAACATGTCAGGAACTAC	1500
REDm WO2003-016839	1501	GCAGCTGGTACACACACGAACTGCGGGGGCGCTGGCTGATGACATGACGATTCATT	1560
REDm WO2003-016839	1501	GCAGCTGGTACACACACGAACTGCGGGGGCGCTGGCTGATGACATGACGATTCATT	1560
REDm WO2003-016839	1561	CCAGGAGGCCAACAGGAAATCTGATGAGAAACGAGCTGAGGGCTATCTTGGCTGGAG	1620
REDm WO2003-016839	1561	CCAGGAGGCCAACAGGAAATCTGATGAGAAACGAGCTGAGGGCTATCTTGGCTGGAG	1620
REDm WO2003-016839	1621	CAGGCAATCTCAAGCTGTAA	1641
REDm WO2003-016839	1621	CAGGCAATCTCAAGCTGTAA	1641

15 / 22
Fig. 15



1 6 / 2 2
F i g . 1 6

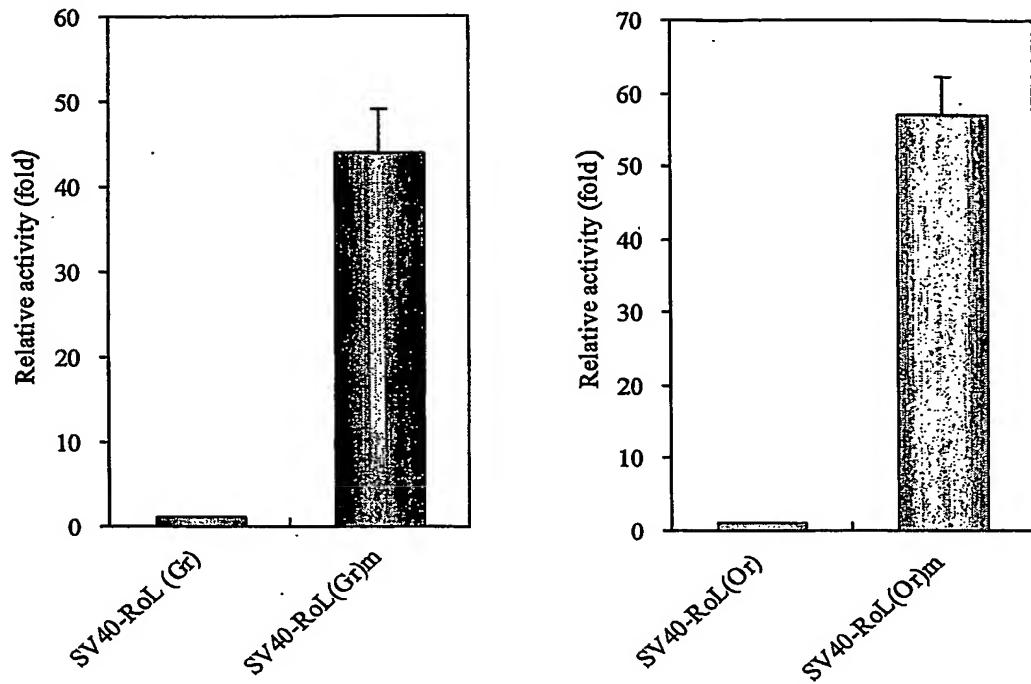


17 / 22

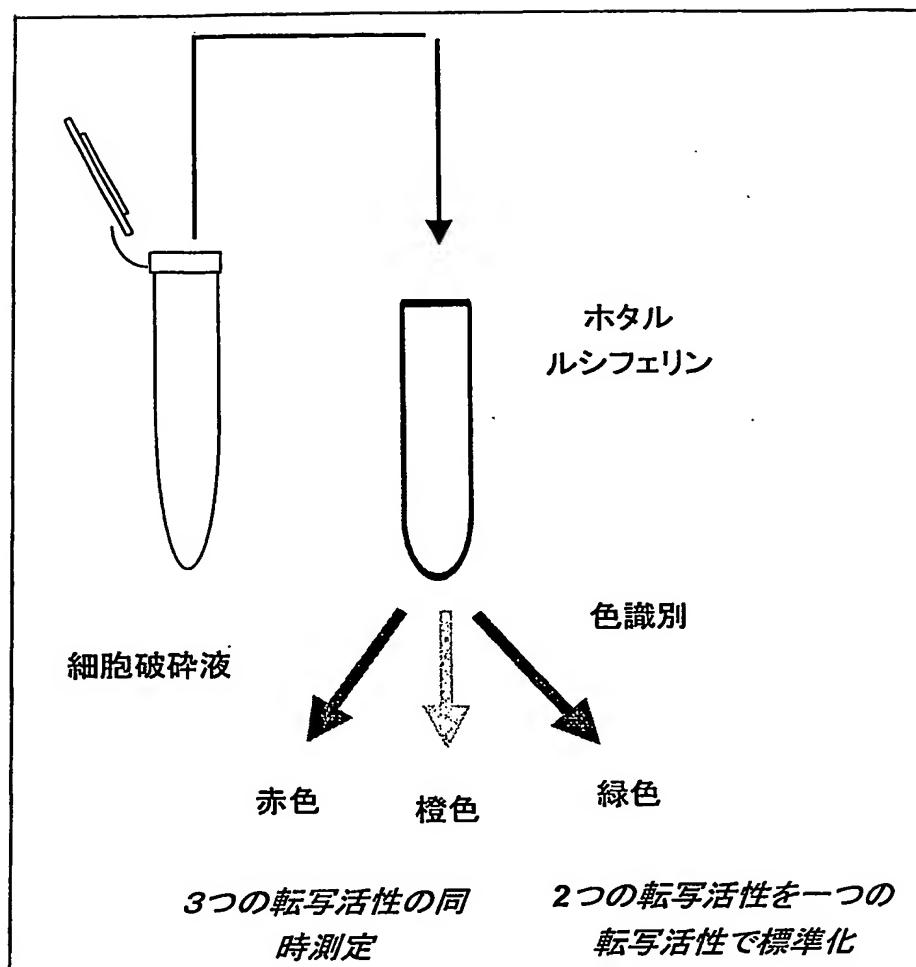
Fig. 17

RoLm	1	ATGCTTAACAGATCATCCCGAAGGGGCCAACCCAAAGGACCCCGTGGGAC	60
RoLWT	1	ATGCTTAATGAAATCATTTTACAGGGGCCAACCCAAAGGACCCCGTGGGAC	60
RoLm	61	GCGGGATTCACTTATAGGGGTTTGACGANTTTTCCTTTAAAGGGAGCCGTGATC	120
RoLWT	61	GCGGGATTCACTTATAGGGGTTTGACGANTTTTCCTTTAAAGGGAGCCGTGATC	120
RoLm	121	GACGGCACACACCAGAGGAGCTGGCTCTTACGGCGACATCTGGAGACAGCTGTAGAC	180
RoLWT	121	GACGGCACACACCAGAGGAGCTGGCTCTTACGGCGACATCTGGAGACAGCTGTAGAC	180
RoLm	181	GGTAAATGCTACGAAGACTAGGCCTGGCCACACGGCTATCGTGCAGCGAG	240
RoLWT	181	GGTAAATGCTACGAAGACTAGGCCTGGCCACACGGCTATCGTGCAGCGAG	240
RoLm	241	AAACAGCACACCTCTTACCCCCGTTATGCGCTTGTATGGGAGCTATACAGCA	300
RoLWT	241	AAACAGCACACCTCTTACCCCCGTTATGCGCTTGTATGGGAGCTATACAGCA	300
RoLm	301	ACCGTAAACGAGATAACCGAGGGGAGCTGGGACACCTTAAACATGAAACCC	360
RoLWT	301	ACCGTAAACGAGATAACCGAGGGGAGCTGGGACACCTTAAACATGAAACCC	360
RoLm	361	GAATGTTGCTGCTCAAAGAAAGCCATTAACATGATGGCCCTGAAAGGAACGTG	420
RoLWT	361	GAATGTTGCTGCTCAAAGAAAGCCATTAACATGATGGCCATGAAAGGAACGTG	420
RoLm	421	AAATTTAAAGAAAGGTAGCTGCTGGAGAGAAATGGGAGCTGGAGAGATGGCGAGGCCAGTGC	480
RoLWT	421	AAATTTAAAGAAAGGTAGCTGCTGGAGAGAAATGGGAGCTGGAGAGATGGCGAGGCCAGTGC	480
RoLm	481	CTAGCAACTTATGGCGGACTGCAACCCAACTGGGACGTGAAACCTTAAACCA	540
RoLWT	481	CTAGCAACTTATGGCGGACTGCAACCCAACTGGGACGTGAAACCTTAAACCA	540
RoLm	541	AAGGAACTTCAACGAAAGGAACTGGGCCATATGTCCTCTGCGACACCCG	600
RoLWT	541	AAGGAACTTCAACGAAAGGAACTGGGCCATATGTCCTCTGCGACACCCG	600
RoLm	601	CTGCCAAAGGGCTGGCTGACCCACAGGCTGAGCTTCTGCTTCACTGCAAG	660
RoLWT	601	CTGCCAAAGGGCTGGCTGACCCACAGGCTGAGCTTCTGCTTCACTGCAAG	660
RoLm	661	GAACCCCTTCGGCACCTGAACTATCTCCACCTCTCCATCTGCTTCCCTC	720
RoLWT	661	GAACCCCTTCGGCACCTGAACTATCTCCACCTCTCCATCTGCTTCCCTC	720
RoLm	721	CACCAACCTGGAAATGTCACAACCGTCTTAATGCTGGCTTAGAGTCTGT	780
RoLWT	721	CACCAACCTGGAAATGTCACAACCGTCTTAATGCTGGCTTAGAGTCTGT	780
RoLm	781	CTCTGAAGATTGCAAGAGAAAGTTCCTGACGACCATGAGAGTACAGAACTTCCA	840
RoLWT	781	CTCTGAAGATTGCAAGAGAAAGTTCCTGACGACCATGAGAGTACAGAACTTCCA	840
RoLm	841	ACAAFCGGCTGGCCCTCTGATGGCTTCTCTGCTAAGAGGCCCTGGTGGAC	900
RoLWT	841	ACAAFCGGCTGGCCCTCTGATGGCTTCTCTGCTAAGAGGCCCTGGTGGAC	900
RoLm	901	TACGACCTGTCAGATAGAGAGCTGGCCACCCGGGGGGCCCTGTGGACAGGTT	960
RoLWT	901	TACGACCTGTCAGATAGAGAGCTGGCCACCCGGGGGGCCCTGTGGACAGGTT	960
RoLm	961	GGCTGGCCGTGGCAAGGGCTGAACTGGGGGGATCTCTGGGGCTACGGGCTGAC	1020
RoLWT	961	GGCTGGCCGTGGCAAGGGCTGAACTGGGGGGATCTCTGGGGCTACGGGCTGAC	1020
RoLm	1021	GGACCTGGCTGGCCGTGGCAAGGGCTGAACTGGGGGGATCTCTGGGGGG	1080
RoLWT	1021	GGACCTGGCTGGCCGTGGCAAGGGCTGAACTGGGGGGATCTCTGGGGGG	1080
RoLm	1081	AGGGTAGCCCTTACGCTCAGGCTAAATGAGAGATCATATGAGGGCTTACCTCTGGGG	1140
RoLWT	1081	AGGGTAGCCCTTACGCTCAGGCTAAATGAGAGATCATATGAGGGCTTACCTCTGGGG	1140
RoLm	1141	CCPAACATGAGGGGAGGCTGCTTACGAGAGAGATCATATGAGGGCTTACCTCTGGGG	1200
RoLWT	1141	CCPAACATGAGGGGAGGCTTACGAGAGAGATCATATGAGGGCTTACCTCTGGGG	1200
RoLm	1201	AAACACAGGCGCAGGAGCCATCGRGAAGGGCTGGCTGGACGGAGCTGG	1260
RoLWT	1201	AAACACAGGCGCAGGAGCCATCGRGAAGGGCTGGCTGGACGGAGCTGG	1260
RoLm	1261	GGGTATAAGACGACGATGGCATTTCTCTGGCTGGCTGGAGTAAAGGACTTCAAG	1320
RoLWT	1261	GGGTATAAGACGACGATGGCATTTCTCTGGCTGGCTGGAGTAAAGGACTTCAAG	1320
RoLm	1321	TACAAGGGCTACCACTGGCCCGCTGAGCTGGAGTGGCTGGCTGGCTGGCTGG	1380
RoLWT	1321	TACAAGGGCTACCACTGGCCCGCTGAGCTGGAGTGGCTGGCTGGCTGG	1380
RoLm	1381	ATPAAAGGATGCGGGGTGACGGCTGGCTGGCGACGGCGAGCTGGCTGG	1440
RoLWT	1381	ATPAAAGGATGCGGGGTGACGGCTGGCTGGCGACGGCGAGCTGGCTGG	1440
RoLm	1441	TGCTATGCTCTCCAGGCTGGCTACGAGGAAAGCTTACGAAACGAAATATGACTATAGCC	1500
RoLWT	1441	TGCTATGCTCTCCAGGCTGGCTACGAGGAAAGCTTACGAAACGAAATATGACTATAGCC	1500
RoLm	1501	GACGGAGTGTGCGACAAAGGCGTGGCTGGAGCTGGCTGGCTGGCTGG	1560
RoLWT	1501	GACGGAGTGTGCGACAAAGGCGTGGCTGGAGCTGGCTGGCTGGCTGG	1560
RoLm	1561	AAAGGGCGACGGCACTGGTGGAGAAGGAGCTGGCTGGCTGGCTGG	1620
RoLWT	1561	AAAGGGCGACGGCACTGGTGGAGAAGGAGCTGGCTGGCTGGCTGG	1620
RoLm	1621	TGCTAGCTTAA	1632
RoLWT	1621	TGCTAGCTTAA	1632

1 8 / 2 2
F i g . 1 8

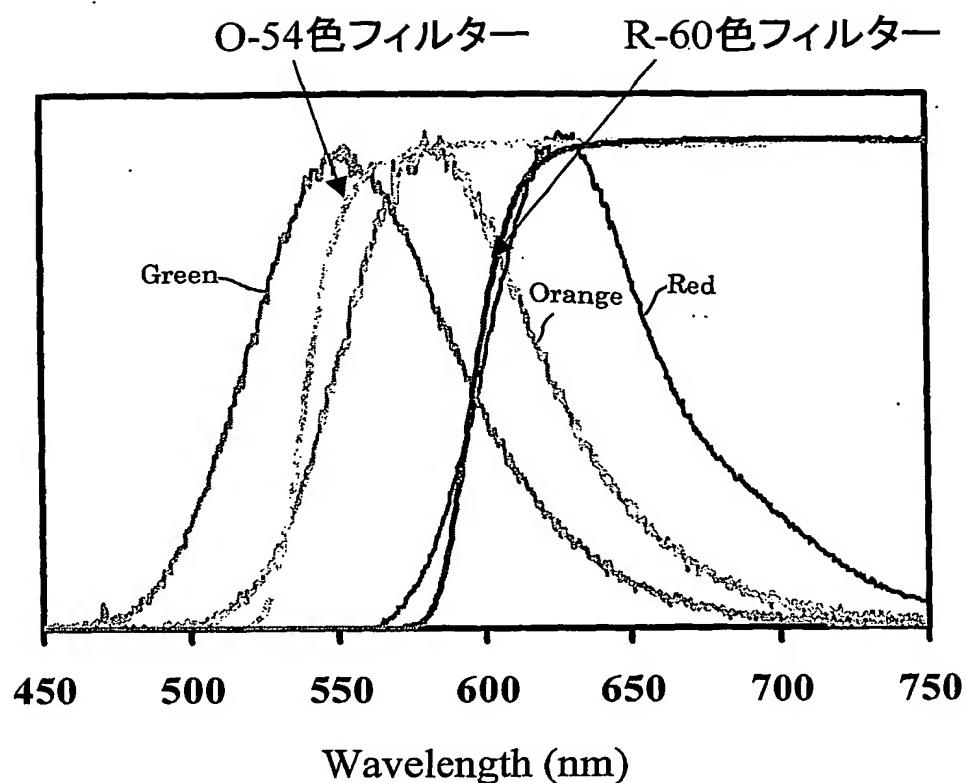


19 / 22
Fig. 19

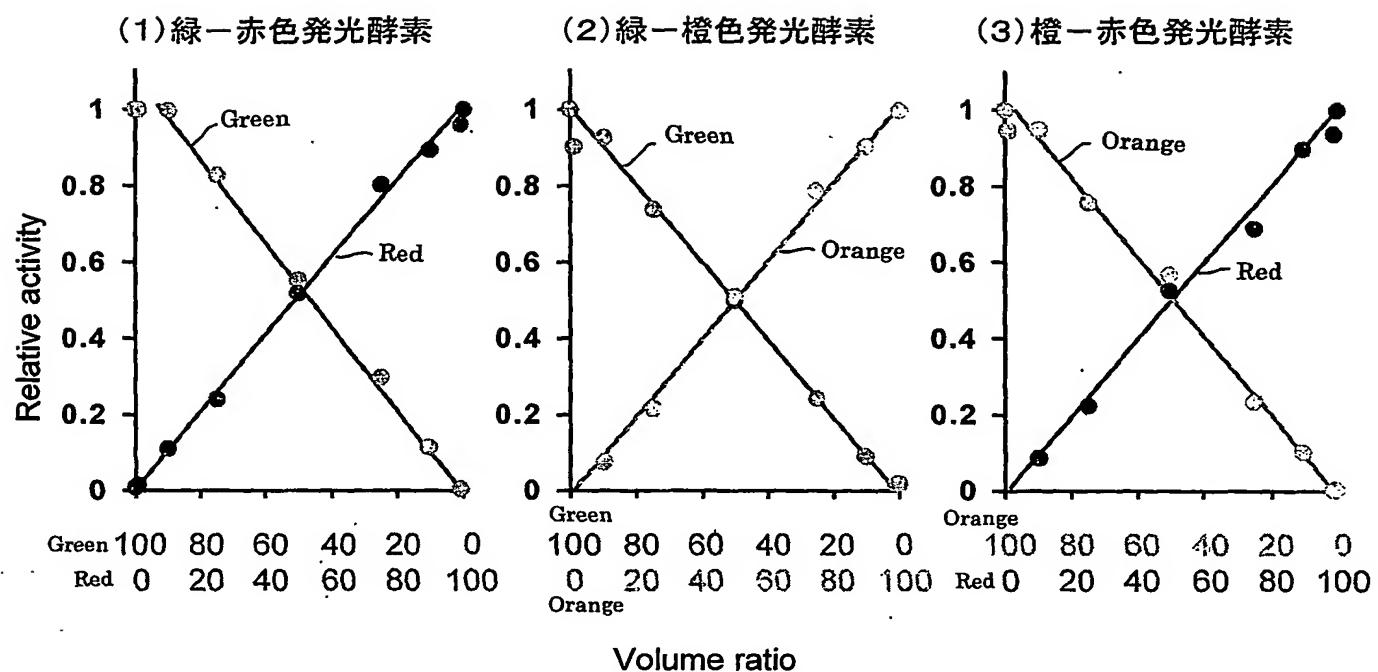


差替え用紙(規則26)

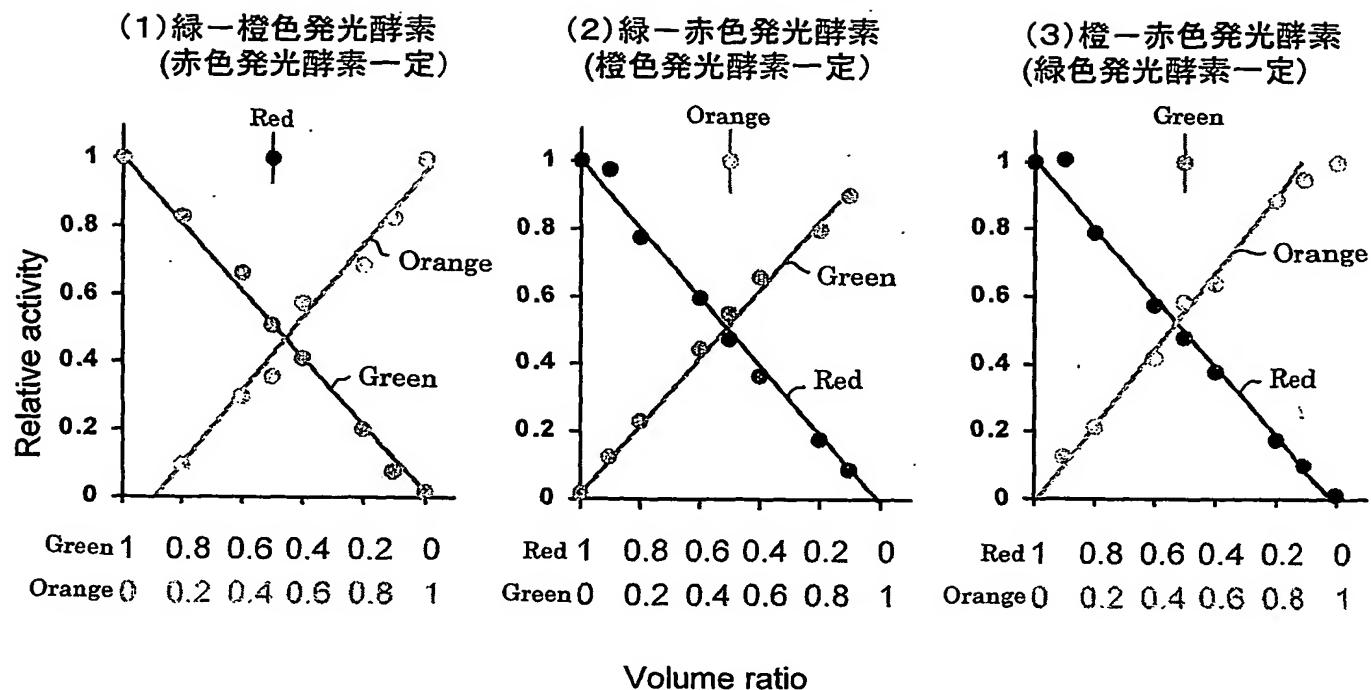
20 / 22
Fig. 20



21/22
Fig. 21



22 / 22
Fig. 22



1/41
SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> Multi-assay system for gene transcription activity

<130> P04-31

<150> JP2003-127629

<151> 2003-05-06

<150> JP2003-407564

<151> 2003-12-05

<160> 65

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1638

<212> DNA

<213> Wild Type Phrixothrix Green Luciferase

<400> 1

atggaagaag	aaaacattag	gcatggagag	cgtcctcg	tatagtcc	tcctggctcg	60		
gcaggacaac	aattatacca	atcattgtat	aaatttgc	at	ttttcc	120		
gatgctcata	caaatgaagt	aatatcatat	gctcaaata	ttgaaaccag	ctgccc	180		
gctgttagta	tagaacaata	tggcttgaat	gaaaacaatg	tttgtgggt	atgcagt	240		
aacaatataa	actttttaa	tcctgtc	ttt	acttaggaat	accagtagca	300		
acatcaaatg	atatgtacac	agatggagag	ttaactgg	tttgaat	atcaaaacca	360		
actatcatgt	ttagttcaaa	gaaagcactc	cgc	tttattc	tgagagtaca	420		
agtttcatta	aaaaagt	cgt	tttatcgat	agcatgtacg	acattaatgg	480		
gtatctacct	tttgcacg	ttatactgac	cacac	tttgc	atccattgtc	540		
aaagattttg	atccc	tttga	aaaaatcg	ca	ttaattatgt	600		
ttgcctaagg	gtgt	ttttact	gagocataga	agtctaa	taagattcg	660		
gatcccattt	atggcactcg	tacgg	ttcca	caa	acatcaa	720		
catcatgcct	ttgaaatgtt	tactacat	tttacttt	tgtaggact	taagg	780		
atgttgaaga	aattt	gaggg	cgcactttc	ttaaaa	acca	ta	caaaatcccc	840

2 / 41

actattttag tggcccttcc agttatggtg tttttggcta aaagcccatt agtcgatcaa 900
tacgatttat cgagcttaac ggaagttgct actggaggag ctccttttagg aaaagatgtc 960
gcagaagcag tagcaaagag gtgtgaaattt cctggaatca tacaaggata tggattaact 1020
gaaacttgct gogctgtaat gattaccctt cataatgctg tgaaaacagg ttcaactgga 1080
agacccttgc catacattaa agctaaagtt ttagataacg ctactggaa ggccgttagga 1140
ccaggagaaa gagggcgaat atgcattaaa agtgaardtga ttatgaaagg atattacaac 1200
aatccggaaag caactattga tactattgac aaagatggtt ggcttcattc tggagatatt 1260
ggatattacg acgaagatgg aaatttcttt atagttgatc gattgaaaga acttattaaa 1320
tacaaggat atcagggttgc gcctgctgaa ctggaaaatc tgctttaca acatccaagt 1380
attgctgatg cgggtgttac tggagttccg gacgaatttg ctggacaatt acctgctgct 1440
tgtgttgtgt tagaatctgg caagacgctg actgaaaagg aagttaaga ttttattgca 1500
gcacaagtca ctccaacaaa gcatttcga ggcgggtgtcg tattttttaga cagtattccg 1560
aaaggcccta ctggaaaact catcagaaag gagctccgag aaatatttgc ccagcgagca 1620
ccaaaatcaa aattataa 1638

<210> 2

<211> 545

<212> PRT

<213> Wild Type Phrixothrix Green Luciferase

<400> 2

Met Glu Glu Glu Asn Ile Arg His Gly Glu Arg Pro Arg Asp Ile Val
1 5 10 15

His Pro Gly Ser Ala Gly Gln Gln Leu Tyr Gln Ser Leu Tyr Lys Phe
20 25 . 30

Ala Ser Phe Pro Glu Ala Ile Ile Asp Ala His Thr Asn Glu Val Ile
35 40 45

Ser Tyr Ala Gln Ile Phe Glu Thr Ser Cys Arg Leu Ala Val Ser Ile
50 55 60

Glu Gln Tyr Gly Leu Asn Glu Asn Asn Val Val Gly Val Cys Ser Glu
65 70 75 80

Asn Asn Ile Asn Phe Phe Asn Pro Val Leu Ala Ala Leu Tyr Leu Gly
85 90 95

Ile Pro Val Ala Thr Ser Asn Asp Met Tyr Thr Asp Gly Glu Leu Thr
100 105 110

Gly His Leu Asn Ile Ser Lys Pro Thr Ile Met Phe Ser Ser Lys Lys
115 120 125

Ala Leu Pro Leu Ile Leu Arg Val Gln Gln Asn Leu Ser Phe Ile Lys
130 135 140

Lys Val Val Val Ile Asp Ser Met Tyr Asp Ile Asn Gly Val Glu Cys
145 150 155 160

Val Ser Thr Phe Val Ala Arg Tyr Thr Asp His Thr Phe Asp Pro Leu
165 170 175

Ser Phe Thr Pro Lys Asp Phe Asp Pro Leu Glu Lys Ile Ala Leu Ile
180 185 190

Met Ser Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Val Leu Ser
195 200 205

His Arg Ser Leu Thr Ile Arg Phe Val His Ser Arg Asp Pro Ile Tyr
210 215 220

Gly Thr Arg Thr Val Pro Gln Thr Ser Ile Leu Ser Leu Val Pro Phe
225 230 235 240

His His Ala Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Ser Tyr Phe Val Val Gly
245 250 255

Leu Lys Val Val Met Leu Lys Lys Phe Glu Gly Ala Leu Phe Leu Lys

4/41

260

265

270

Thr Ile Gln Asn Tyr Lys Ile Pro Thr Ile Val Val Ala Pro Pro Val
275 280 285

Met Val Phe Leu Ala Lys Ser Pro Leu Val Asp Gln Tyr Asp Leu Ser
290 295 300

Ser Leu Thr Glu Val Ala Thr Gly Gly Ala Pro Leu Gly Lys Asp Val
305 310 315 320

Ala Glu Ala Val Ala Lys Arg Leu Lys Leu Pro Gly Ile Ile Gln Gly
325 330 335

Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Cys Cys Ala Val Met Ile Thr Pro His Asn
340 345 350

Ala Val Lys Thr Gly Ser Thr Gly Arg Pro Leu Pro Tyr Ile Lys Ala
355 360 365

Lys Val Leu Asp Asn Ala Thr Gly Lys Ala Leu Gly Pro Gly Glu Arg
370 375 380

Gly Glu Ile Cys Phe Lys Ser Glu Met Ile Met Lys Gly Tyr Tyr Asn
385 390 395 400

Asn Pro Glu Ala Thr Ile Asp Thr Ile Asp Lys Asp Gly Trp Leu His
405 410 415

Ser Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Asp Gly Asn Phe Phe Ile Val
420 425 430

Asp Arg Leu Lys Glu Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val Ala Pro
435 440 445

Ala Glu Leu Glu Asn Leu Leu Leu Gln His Pro Ser Ile Ala Asp Ala
450 455 460

5/41

Gly Val Thr Gly Val Pro Asp Glu Phe Ala Gly Gln Leu Pro Ala Ala
 465 470 475 480

Cys Val Val Leu Glu Ser Gly Lys Thr Leu Thr Glu Lys Glu Val Gln
 485 490 495

Asp Phe Ile Ala Ala Gln Val Thr Pro Thr Lys His Leu Arg Gly Gly
 500 505 510

Val Val Phe Val Asp Ser Ile Pro Lys Gly Pro Thr Gly Lys Leu Ile
 515 520 525

Arg Lys Glu Leu Arg Glu Ile Phe Ala Gln Arg Ala Pro Lys Ser Lys
 530 535 540

Leu
 545

<210> 3
<211> 1641
<212> DNA
<213> Wild Type Phrixothrix Red Luciferase

<400> 3		
atggaagaag aaaacattgt gaatggagat cgtccctcggt atctagtttt tcctggcaca	60	
gcaggactac aatttatatca atcattatat aaatattcat atattactga cggaataatc	120	
gatgccata ccaatgaagt aatatcatat gctcaaataat ttgaaaccag ctggcgcttg	180	
gcagttagtc tagaaaaata tggcttggat cataacaatg ttgtggcaat atgcagtgaa	240	
aacaacatac acttttttgg cccttaatt gctgcttat accaaggaat accaatggca	300	
acatcaaatg atatgtacac agaaaggag atgattggcc atttgaatat atcgaaacca	360	
tgccttatgt tttgttcaaa gaaatcactc ccatttattc tgaaagtaca aaaacatcta	420	
gatttcctta aaaaagtcat agtcattgtat agtatgtacg atatcaatgg cgttgaatgc	480	
gtattttagct ttgtttcacg ttatactgat cacgcctttg atccagtgaa atttaaccca	540	
aaagagtttgc atcccttgga aagaaccgca ttaattatga catcatctgg aacaactggaa	600	
ttgcctaaag gggtagtaat aagccataga agtataacta taagattcgt ccatagcagt	660	

6 / 41

gatccccatct atggtaactcg tattgtccta gatacatcaa ttcttgctat agcaccgttc 720
catcatgcct ttggactgtt tactgcacta gcttactttc cagtaggact taagattgt 780
atggtaaga aatttgaggg cgaattcttc taaaaacca tacaaaatta caaaatcgct 840
tctattttag ttcctcctcc aattatggta tattttggcta aaagtccatt agtcgatgaa 900
tacaatttat cgagcttaac ggaaattgtc tgtggagggt ctccctttagg aagagatatc 960
gcagataaag tagcaaagag attgaaagta catggaatcc tacaaggata tggattaacc 1020
gaaacctgca gcgcotctaactt acttagcccc aatgatcgag aactttaaaaa aggtgcaattt 1080
ggaacgccta tgccatatatgt tcaagttaaa gttatagata tcaataactgg gaaggcgcta 1140
ggaccaagag aaaaaggcga aatatgcttc aaaagtcaaa tgcttatgaa aggatatcac 1200
aacaatccgc aagcaactcg tgatgctttt gacaaagatg gttggcttca tactggggat 1260
cttggatatt acgacgaaga cagatttac tatgttagttt atcgattgaa agaacttatt 1320
aaatataaaag gatatcaggt tgccctgctt gaactggaaa atctgctttt acaacatcca 1380
aatatttctg atgcgggtgt tattggattt ccggacgaat ttgctggtca attaccttcc 1440
gcgtgtgttgc tgtagagcc tggtaagaca atgaccgaaa aggaagttca ggatttatatt 1500
gcagagctag tcactacaac taaacatctt cgaggcggtg tcgtattttt agatagtatt 1560
ccaaaaggcc caacaggaaa actcatgaga aacgaactcc gtgcaatatt tgcccccggaa 1620
caggcaaaat caaaattata a 1641

<210> 4

<211> 546

<212> PRT

<213> Wild Type Phrixothrix Red Luciferase

<400> 4

Met Glu Glu Glu Asn Ile Val Asn Gly Asp Arg Pro Arg Asp Leu Val
 1 5 .10 15

Phe Pro Gly Thr Ala Gly Leu Gln Leu Tyr Gln Ser Leu Tyr Lys Tyr
20 25 30

7/41

Ser Tyr Ile Thr Asp Gly Ile Ile Asp Ala His Thr Asn Glu Val Ile
35 40 45

Ser Tyr Ala Gln Ile Phe Glu Thr Ser Cys Arg Leu Ala Val Ser Leu
50 55 60

Glu Lys Tyr Gly Leu Asp His Asn Asn Val Val Ala Ile Cys Ser Glu
65 70 75 80

Asn Asn Ile His Phe Phe Gly Pro Leu Ile Ala Ala Leu Tyr Gln Gly
85 90 95

Ile Pro Met Ala Thr Ser Asn Asp Met Tyr Thr Glu Arg Glu Met Ile
100 105 110

Gly His Leu Asn Ile Ser Lys Pro Cys Leu Met Phe Cys Ser Lys Lys
115 120 125

Ser Leu Pro Phe Ile Leu Lys Val Gln Lys His Leu Asp Phe Leu Lys
130 135 140

Lys Val Ile Val Ile Asp Ser Met Tyr Asp Ile Asn Gly Val Glu Cys
145 150 155 160

Val Phe Ser Phe Val Ser Arg Tyr Thr Asp His Ala Phe Asp Pro Val
165 170 175

Lys Phe Asn Pro Lys Glu Phe Asp Pro Leu Glu Arg Thr Ala Leu Ile
180 185 190

Met Thr Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Val Ile Ser
195 200 205

His Arg Ser Ile Thr Ile Arg Phe Val His Ser Ser Asp Pro Ile Tyr
210 215 220

Gly Thr Arg Ile Ala Pro Asp Thr Ser Ile Leu Ala Ile Ala Pro Phe
225 230 235 240

His His Ala Phe Gly Leu Phe Thr Ala Leu Ala Tyr Phe Pro Val Gly
245 250 255

Leu Lys Ile Val Met Val Lys Lys Phe Glu Gly Glu Phe Phe Leu Lys
260 265 270

Thr Ile Gln Asn Tyr Lys Ile Ala Ser Ile Val Val Pro Pro Pro Ile
275 280 285

Met Val Tyr Leu Ala Lys Ser Pro Leu Val Asp Glu Tyr Asn Leu Ser
290 295 300

Ser Leu Thr Glu Ile Ala Cys Gly Gly Ser Pro Leu Gly Arg Asp Ile
305 310 315 320

Ala Asp Lys Val Ala Lys Arg Leu Lys Val His Gly Ile Leu Gln Gly
325 330 335

Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Cys Ser Ala Leu Ile Leu Ser Pro Asn Asp
340 345 350

Arg Glu Leu Lys Lys Gly Ala Ile Gly Thr Pro Met Pro Tyr Val Gln
355 360 365

Val Lys Val Ile Asp Ile Asn Thr Gly Lys Ala Leu Gly Pro Arg Glu
370 375 380

Lys Gly Glu Ile Cys Phe Lys Ser Gln Met Leu Met Lys Gly Tyr His
385 390 395 400

Asn Asn Pro Gln Ala Thr Arg Asp Ala Leu Asp Lys Asp Gly Trp Leu
405 410 415

His Thr Gly Asp Leu Gly Tyr Tyr Asp Glu Asp Arg Phe Ile Tyr Val
420 425 430

Val Asp Arg Leu Lys Glu Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val Ala
435 440 445

Pro Ala Glu Leu Glu Asn Leu Leu Leu Gln His Pro Asn Ile Ser Asp
 450 455 460

Ala Gly Val Ile Gly Ile Pro Asp Glu Phe Ala Gly Gln Leu Pro Ser
 465 470 475 480

Ala Cys Val Val Leu Glu Pro Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys Glu Val
 485 490 495

Gln Asp Tyr Ile Ala Glu Leu Val Thr Thr Thr Lys His Leu Arg Gly
 500 505 510

Gly Val Val Phe Ile Asp Ser Ile Pro Lys Gly Pro Thr Gly Lys Leu
 515 520 525

Met Arg Asn Glu Leu Arg Ala Ile Phe Ala Arg Glu Gln Ala Lys Ser
 530 535 540

Lys Leu
 545

<210> 5

<211> 1760

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase of US2002-0119542-A1

<400> 5

gtgacagttt agttcagtag aagatttttt tgagatcaaa atggaagaag aaaacgttgt 60

aatggagat cgtccctcggt atctagttt tcctggcaca gcaggactac aattatatca 120

atcattatat aaatattcat atattactga cggaataatc gatgccata ccaatgaagt 180

aatatcatat gctcaaataat ttgaaaccag ctgcgcgttg gcagttagtc tagaaaaata 240

tggcttggat cataacaatg ttgtggcaat atgcagtgaa aacaacatac acttttttgg 300

cccttaatt gctgcttat accaaggaat accaatggca acatcaaatac atatgtacac 360

agaaaggag atgattggcc atttgaatat atcgaaccca tgccttatgt tttgttcaaa 420

gaaatcactc ccatttattc tgaaagtaca aaaacatcta gatttcctta aaagagtcat 480

10 / 41

agtcaattgat agtatgtacg atatcaatgg cgttgaatgc gtathtagct ttgattcacg	540
taataactgat cacgccttig atccagtgaa atttaaccga aaagagtttgc atcccttgaa	600
aagaaccgca ttaattatga catcatctgg aacaactgga ttgcctaaag ggtagtaat	660
aagccataga agtataacta taagattcgt ccatagcagt gatcccatct atggtaactcg	720
tattgctcca gatacatcaa ttcttgctat agcaccgttc catcatgcct ttggactgtt	780
tactgcacta gcttactttc cagtaggact taagattgta atggtaaga aatttgagg	840
cgaatttttc ttaaaaacca tacaaaatta caaaatcgct tctattgttag ttccctcc	900
aattatggta tatttggcta aaagtccatt agtcgatgaa tacaattgct cgagcttaac	960
ggaaattgct agtggaggct ctcctttagg aagagatatc gcagataaag tagcaaagag	1020
attgaaagta catggaatcc tacaaggata tggattaacc gaaacctgca ggcgtctaat	1080
acttagcccc aatgatcgag aactaaaaaa aggtgcaatt ggaacgccta tgccatatgt	1140
tcaagttaaa gttatagata tcaatactgg gaaggcgcta ggaccaagag aaaaaggcga	1200
aatatgcttc aaaagtcaaa tgcttatgaa aggatatcac aacaatccgc aagcaactcg	1260
tgatgctctt gacaaagatg gttggcttca tactggggat ctggatatt acgacgaaga	1320
cagatttatac tatgtatggat atcgattgaa agaacttatt aaatataaag gatatcaggt	1380
tgccgcgtctt gaaactggaaa atctgctttt acaacatcca aatatttctg atgcgggtgt	1440
tattgaattc cggacgaatt tgctggtcaa ttaccttcc gctgtgttgt tgtagagcc	1500
tggtaagaca atgaccgaaa aggaagttca ggattatatt gcagagctag tcactacaac	1560
taaacatctt cgaggcggtg tcgtatattt agatagtatt ccaaaaggcc caacaggaaa	1620
actcatgaga aacgaactcc gagcaatatt tgcccgaa caggcaaaat caaaattata	1680
agctcaatat attgcttttag ttataaaatg tatgtaatca aatttttagaa cctaatacat	1740
tcattgagag cctaaaaaaaaaa	1760

<210> 6

<211> 1641

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase of WO2003/016839

11 / 41

<400> 6

atggaagaag aaaacgtggt gaatggagat cggcctaggg atctggtgtt tcccgccaca 60
gcaggactcc agctgtacca gtcactgtat aagtattcat acatcaactga cgggataatc
gacgcccata ccaacgaggt catctcatat gctcagatct ttgaaacctc ctgccgctg 180
gcagtgtcac tggagaagta tggcctggat cacaacaatg tggtgccat ctgttctgaa 240
aacaacatac acttttcgg ccccctgatt gctgcctgt accaaggcat cccaatggca 300
acatcaaacg acatgtacac agagagggag atgataggcc atctgaacat ctccaagcca 360
tgcctgatgt tctgttcaaa gaaatcactg cccttcattc tgaaggtgca gaagcacctg 420
gactttctga aaaaagtcat agtcattgtat tccatgtacg atatcaatgg cgtggagtgc 480
gtcttctcct ttgtctcgag gtacactgat cacgccttcg acccagtgaa gttcaacccc 540
aaagagttcg accccctcgaa aagaaccgcc ctgattatga catcatctgg gacaactgga 600
ctgcctaagg gggtcgtgat ctcccacaga tctataacta tcagattcgt ccattttcc 660
gatccccatct acggcaccag gattgcccca gacacatcaa ttctggctat cgcaccctc 720
catcacgcct tggactgtt tactgcactg gcttacttcc ctgtcggact gaagattgtc 780
atggtaaga aatttgaggg cgagttcttt ctgaaaacca tacaaaatta caagatcgct 840
tctatttgcg tgcccttcc tattatggtc tatctggcta agtccccct ggtcgatgaa 900
tacaatttat ttctctgac cgaaatcgca tgcggaggct ctctctggg gagagacatc 960
gcagataaaag tcgccaagag actgaaagtg catggaatcc tccagggata tgggctgacc 1020
gagacctgtt cogctctgat actgtctccc aacgatcggg aactgaaaaa gggggcaatc 1080
ggaaccccta tgccatacgt gcaagtgaaa gtgatcgaca tcaataccgg gaaggccctg 1140
ggaccaagag agaaaggcga gatctgcttc aagtctcaga tgctgatgaa ggggtatcac 1200
aacaatcctc agggcaactg ggatgctctg gacaaggatg ggtggctgca cactggggac 1260
ctggatatt acgacgaaga cagatttac tatgtcgtgg acaggctgaa agagctgatc 1320
aagtataaaag ggtatcaggt cgccctgct gagttggaaa acctgctgtt gcagcacccc 1380
aatatctctg atgccggcgt gattgaaatt ccggacgaat ttgctggtca attaccttcc 1440
gcctgtgtgg tgctggagcc tggcaagaca atgaccgaga aagaagtgca ggactacatt 1500

12 / 41

gcagagctgg tcactacaac taaacatctg aggggggggg	tcgtctttat agattccatt	1560
ccaaagggcc caacaggaa actgatgaga aacgaactga	ggcaatctt tgctcggaa	1620
caggcaaaaa tcgctgtgta a		1641

<210> 7

<211> 1641

<212> DNA

<213> Mutant Phrixothrix Red Luciferase of the Invention

<400> 7

atggaagaag agaacatcg	aatggcgat cgccctcggg atctggtgtt ccctggcaca	60
gcggccctgc agctgtatca	gtccctgtat aaatactctt acatcacccga cggaaatcatc	120
gacgcccaca ccaacgaggt	gatctccat gcccagattt tcgaaacaag ttgcccctg	180
gcogtgagcc tggagaagta	tggcctggat cacaacaacg tggtgccat ttgcagcgag	240
aacaacatcc acttcttcgg	ccctctgatc gctccctat accagggat tccaatggcc	300
acatccaacg atatgtacac	cgagagggag atgatggcc acctgaacat ctccaagcca	360
tgtctgtatgt tctgttccaa	gaagtccctg ccattcatcc tgaaggtgca gaagcacctg	420
gactttctca agaaggtgat	cgtgatcgac agcatgtacg acatcaacgg cgtggagtgc	480
gtgttcagtt tcgtgtcccc	gtacaccgat cacgcgttcg atccagtgaa gttcaaccct	540
aaagagtttg atccccctgga	gagaaccgcg ctgatcatga catccctctgg aacaaccggc	600
ctgcctaagg gcgtggtgat	cagccacagg agcatcacca tcagattcg	660
gatcccatct acggcacccg	ccacagcagg agcatcacca tcagattcg	720
caccacgcct tcggactgtt	taccgcctg gcttactttc cagtggccct gaagatcg	780
atggtaaaaa agttttaggg	cgagtttttc ctgaagacca tccagaacta caagatcg	840
tctatcg	tggccctcc aatcatggtg tatctggcca agagccctct ggtggatgag	900
tacaatctgt ccagcctgac	agagatcgcc tgtggccgt cccctctggg cagagacatc	960
gcgcacaagg tggccaagag	actgaaggc cacggcatcc tgcaggctta tggcctgacc	1020
gagacctgta gcgcctgtat	cctgagccccc aacgatagag agctgaagaa gggcgccatc	1080
ggcaccccta tgcctatgt	ccaggtgaag gtgattgaca tcaacacccgg caaagccctg	1140

13 / 41

ggaccaagag agaaggcgaa	gatttgcttc aagagccaga	tgtgtatgaa gggctaccac	1200
aacaacccac aggccaccag ggatgccctg	gacaaggacg ggtggctgca	caccggcgat	1260
ctgggctact acgacgagga cagattcatc	tatgtggtgg atcggctgaa	agagctcatc	1320
aagtacaagg gctaccaggt ggcccctgcc	gagctggaga acttgcttct	gcagcacccct	1380
aacatctctg atgccggcgt	catcggcatc ccagacgagt	ttgccggcca gctgccttcc	1440
gcctgtgtcg tgctggagcc tggcaagacc	atgaccgaga aggaggtgca	ggatttatatc	1500
gccgagctgg tgaccaccac caagcacctg	cggggcggcg tggtgttcat	cgacagcatt	1560
ccgaaaggcc caacaggcaa gctgtatgaga	aacgagctga gggccatctt	tgcccgcgag	1620
caggccaaat ccaagctgt a			1641

<210> 8

<211> 1632

<212> DNA

<213> Wild Type Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 8

atgcctaattt aaatcatttt acatggggcc	aaacctcgag acccgtaga	cctggaaact	60
gcaggaattt aattgtatag ggctttgacg	aatttttctt tttaaggga	agccttgatc	120
gacgctcaca ccgaggaagt agtatcttac	ggggacattt tggaaaacag	ctgtcgatta	180
gcaaaatgct acgaaaacta tggattacgc	caaaacagcgc tcataatcggt	gtgcagcgaa	240
aacagcacga tcttcttcta ccccgtaatt	gcgcgtttgt atatggagtt	cataacagca	300
accgtaaatg atagttatac cgaacggaa	ttattggaaa cttttaaatat	atcaaaaccg	360
gaatttagtgt tctgctcgaa gaaagccatt	aaaaatatga tggcattgaa	aaggaacgtc	420
aatttttatta aaaaggttgtt acttttggat	agtaaggaag acatggcgaa	agcccaagtgt	480
cttagcaact ttatggcact ctattcgaa	cccaattttgg acgttaagaaa	ttttaaacca	540
cgcgattttt atgctaaaga acaagtcgt	ttgatcatgt cctcatcggt	aacaaccggg	600
ctgccccaaag gggtcgtgtt aacccatcga	aatttaagcg ttgcgttcgt	acactgcaag	660
gatecccttat tcggcacaag aactattcca	tcaacttcga ttttatctat	cgttcccttc	720
catcatcggt ttggaatgtt tacaacgttg	tcttattttta tagtagggct	tagagttgt	780

14 / 41

ttactgaaaa gattcgaaga gaagttttc ttaagcacca ttgaaaagta cagaattcca	840
actatcgttc ttgcgcggcc cgtaatggta ttcctagcta agagcccctt agttgatcag	900
tacgatttgt ccagtattag agaagtcgct accgggtggcg cacctgttgg aactgaagtg	960
gcagtggccg ttgcgaaacg gttgaaaatt ggccggaaatcc ttcagggcta cggattgacc	1020
gaaacgtgtt gcgccgtatt aattaccct catgacgacg ttaaaacagg ttctaccggg	1080
agggtagctc cttaacgtcca agcgaaaatt gtagatctt ccaccggaaa atctctgggg	1140
ccaaataaaa gaggagagct ttgtttaaa agtgagatca ttatgaaggg ctatttcaac	1200
aataaacaag ctacggaaga agccatcgat aaagaaggat gtttacattc tggagatgtt	1260
gggttattatg acgacgatgg tcatttcttc gtagtcgatc gttttaagga acttatcaag	1320
tacaaggat atcaagtagc accggctgaa ctggagtgg tgccttgca acatccatct	1380
attaaagatg ccgggtttac tggcgcccc gacgaagctg ctggagaact accaggtgct	1440
tgtatagttc tccaagaagg aaaaagtctt actgaacaag aaattattga ctatatagcc	1500
gaacgagttt cgccaactaa acgtatacg ggtggagtgg tcttcgttga tgatattcct	1560
aaagggcga ctggaaaact ggtcagaagt gaattacgaa aacttcttgc tcagaagaaa	1620
tcgaaaactat aa	1632

<210> 9

<211> 1632

<212> DNA

<213> Wild Type Rhagophthalmus ohbai Orange Luciferase

<400> 9

atgcctaattt aatcatttt acatggggcc aaacctcgag acccggttgc cctggaaact	60
gcaggaattt aattgtatag ggctttgacg aatttttcct tttaaggga agccttgc	120
gacgctcaca ccgaggaagt agtatcttac gggacattt tggaaaacag ctgtcgatta	180
gcaaaatgct acgaaaacta tggattacgc caaaacagcg tcatacggt gtgcagcgaa	240
aacagcacga tcttcttcta ccccgtaatt ggcgtttgt atatggagt cataacagca	300
accgttaatg atagttatac cgaacggaa ttattggaaa cttaaatat atcaaaacgg	360
gaattagtgt tctgctcgaa gaaagccatt aaaaatatga tggcattgaa aaggaacgtc	420

15 / 41

aattttatta	aaaaggtagt	acttttggat	agtaaggaaag	acatgggcga	agcccagtgt	480
cttagcaact	ttatggcacg	ctattcgaa	cccaatttgg	acgtaagaaa	ttttaaacca	540
cgcgattttg	atgctaaaga	acaagtcgct	ttgatcatgt	cctcatcggg	aacaaccggg	600
ctgccccaaag	gggtcgtgtt	aaccatcgaa	aatttaagcg	ttcgcttcgt	acactgcaag	660
gatcccttat	toggcaatag	aactattcca	tcaacttcga	tttatctat	cgttcccttc	720
catcatcgct	ttggaatgtt	tacaacgttg	tcttattttt	tagtagggct	tagagttgt	780
ttactgaaaa	gattcgaaga	gaagtttttc	ttaagcacca	ttgaaaagta	cagaattcca	840
actatcgttc	ttgcggccgc	cgtaatggta	ttcctagcta	agagccctt	agttgatcag	900
tacgatttgt	ccagtatttag	agaagtcgct	accgggtggcg	cacctgttgg	aactgaagt	960
gcagtggccg	ttgcgaaaacg	gttggaaatt	ggcggaatcc	ttcagggcta	cggattgacc	1020
gaaacgtgtt	gcccgttatt	aattaccct	catgacgacg	ttaaaacagg	ttctaccggg	1080
aggtagctc	cttaogtcca	agcgaaaatt	gtagatctt	ccaccggaaa	atctctgggg	1140
ccaaataaaa	gaggagagct	ttgtttaaa	agtgagatca	ttatgaaggg	ctattcaac	1200
aataaacaag	ctacggaaga	agccatcgat	aaagaaggat	ggttacattc	tggagatgtt	1260
gggtattatg	acgacgatgg	tcatttcttc	gtagtcgatc	gtttaaagga	acttatacaag	1320
tacaagggat	atcaagtagc	accggctgaa	ctggagtgg	tgctttgca	acatccatct	1380
attaaagatg	ccgggtttac	tggcgttccc	gacgaagctg	ctggagaact	accaggtgct	1440
tgtatagttc	tccaaagaagg	aaaaagtott	actgaacaag	aaattattga	ctatatagcc	1500
gaacgagtti	cgc当地actaa	acgtatacgt	ggtggagtgg	tcttcgttga	tgtatattcct	1560
aaaggggcga	ctggaaaact	ggtcagaagt	gaattacgaa	aacttcttgc	tcagaagaaa	1620
tcgaaactat aa						1632

<210> 10

<211> 1632

<212> DNA

<213> Mutant Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase of the Invention

<400> 10

atggcttaacg agatcatcct gcacggccgc aagcccaggg accccctgga cctggcacc 60

16 / 41

gccccatc agctctacag gcccctgacc aacttctct tcctgaggga ggccctgatc 120
gacgcccaca ccgaggaggt ggtgtttac gccgacatcc tggagaacag ctgttagactg 180
gctaagtgt acgagaacta cggctgcgc cagaacacgc tgatctccgt gtgcagcgag 240
aatagcacca tcttcttcta cccctgtatc gcccctgt acatggcgt gatcaccc 300
accgtgaacg acagctacac cgagcgggag ctgctggaga ccctgaacat ctccaagccc 360
gaactggtgt tctgtccaa gaaggccatc aagaacatga tggccctgaa gaggaacgtg 420
aacttcatca agaaggttgt gctgctggac agcaaggagg atatggcga ggcccagtgc 480
ctgagcaact tcatggcccgt tactccgag cccaacctgg acgtgagaaa cttcaagcca 540
agggacttcg acgccaagga gcaggtggcc cttattatgt ctcctctgg caccaccggc 600
ctgccaaagg gcgtggtgct gacccacagg aacctgagcg tgcgcttgcgt ccactgcaag 660
gaccctgt tcggcaccag aaccatcccc tccacccca tccctgtccat cgtgcccttc 720
caccacgcct tcggaatgtt cacaaccctg tcctacttca tctgggcgt gagagtggtg 780
ctgctgaaga gattcgagga gaagtttttc ctgagcacca tcgagaagta cagaatcccc 840
acaatcgtgc tggccctcc tgtgtatggtg ttccctggcta agagccccct ggtggaccag 900
tacgacctgtt ccagcatcag agaggtggcc accggcggcgc cccctgtggg caccgaggtt 960
gccgtggccg tggccaagcg gctgaagatc ggccgcattcc tccaggccta cggccctgacc 1020
gagacctgct gcccgtgct gatcacccttcc caccgacgcg tgaagaccgg ctccaccggc 1080
agggttagccc cctacgtgoa ggctaaagatc gtggacctga ccacccgcaaa gtccctggga 1140
cctaacaaga gaggcgagct gtgttcaag agcgagatca tcatgaaggg ctacttcaac 1200
aacaaggcagg ccaccgagga ggccatcgac aaggaggcgt ggctgcactc cggcgacgtg 1260
ggataactacg acgacgatgg acatttttc gtggatggacc ggctgaaaga gctgatcaag 1320
tacaaggcgtt accaggtggc ccccgccgag ctggatggc tgctgtccat caccatcc 1380
atcaaggatg cggcgatgac cggcgatccc gacgaggccg cccggcgtt gcccggcc 1440
tgcatcgatgc tccaggaggg caagagcctg accgagcagg agatcatcga ctacatcgcc 1500
gagcgagtgt ctcccacca ggcgcacccgg ggccggatcg tcttcgtggc cgacatcccc 1560
aaggccgcca cccggcaagct ggtgagaagc gagctgcggc agctgctggc ccagaagaag 1620

tccaaagctgt aa	1632
----------------	------

<210> 11

<211> 1632

<212> DNA

<213> Mutant Rhagophthalmus ohbai Orange Luciferase of the Invention

<400> 11

atggctaacg agatcatcct gcacggcgcc aagcccagg acccccctggga cctgggcacc gcggcattc agctctacag ggccctgacc aacttctcct tccctgaggga ggccctgtac gacgcccaca ccgaggaggt ggtgtttac gccgacatcc tggagaacag ctgttagactg gctaagtgtc acgagaacta cggcctgcgc cagaacagcg tgcacatgt gtgcaggcag aatagcacca tcttcttcta cccctgtatc gccgocctgt acatgggcgt gatcaccgcc accgtgaacg acagctacac cgagcgggag ctgctggaga ccctgaacat ctccaagccc gaactgttgt tctgctccaa gaaggccatc aagaacatga tggccctgaa gaggaacgtg aacttcatca agaagggttgt gctgctggac agcaaggagg atatggcga ggcccagtgc ctgagcaact tcatggcccg gtactccgag cccaacctgg acgtgagaaa cttcaagcca agggacttcg acgccaagga gcaggtggcc cttattatgt cctcctctgg caccaccggc ctgccaaagg gcgtgggtgt gacccacagg aacctgagcg tgccgttgcgt ccactgcaag gaccctgt tcggcaacag aaccatcccc tccacctcca tccctgtccat cgtcccttc caccacgcct tcggaatgtt cacaaccctg tcctacttca tccctggcgt gagagtggtg ctgctgaaga gattcgagga gaagtttttc ctgagcacca tcgagaagta cagaatcccc acaatcggtgc tggccctcc tgtgtatggtg ttccctggcta agagcccccgt ggtggaccag tacgacctgt ccagcatcag agaggtggcc accggcggcg cccctgtggg caccgagggt gccgtggccg tggccaaagcg gctgaagatc ggcggcatcc tccagggcta cggccgtacc gagacctgtgt ggcggcgtgt gatcacccttcc cacgacgacg tgaagacggg ctccaccggc agggttagccc cctacgtgca ggctaaagatc gtggacctga ccacccggcaa gtccctggga cctaacaaga gaggcgagct gtgttcaag agcgagatca tcatgaaggg ctacttcaac aacaaggcagg ccaccggagga ggccatcgac aaggagggtgt ggctgcactc cggcgacgtg	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260
--	---

18/41

ggatactacg acgacgatgg acatttcttc gtggtgacc ggctgaaaga gctgatcaag	1320
tacaaggcgtt accaggtggc ccccgccgag ctggagtggc tgctgctcca gcacccatcc	1380
atcaaggatg ccggcgtgac cggcgtgcc gacgaggccg ccggcgcagct gcccggcgc	1440
tgcacatcg tccaggaggg caagagcctg accgagcagg agatcatcgat ctacatcgcc	1500
gagcgagtgt ctccccacaa ggcgcattccgg ggccggatcg tottcgtgga cgacatcccc	1560
aagggcgc aaggcgcaggct ggtgagaagc gagctgcgga agctgctggc ccagaagaag	1620
tccaaagctgt aa	1632

<210> 12

<211> 543

<212> PRT

<213> Wild Type Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 12

Met Pro Asn Glu Ile Ile Leu His Gly Ala Lys Pro Arg Asp Pro Leu			
1	5	10	15

Asp Leu Gly Thr Ala Gly Ile Gln Leu Tyr Arg Ala Leu Thr Asn Phe		
20	25	30

Ser Phe Leu Arg Glu Ala Leu Ile Asp Ala His Thr Glu Glu Val Val		
35	40	45

Ser Tyr Ala Asp Ile Leu Glu Asn Ser Cys Arg Leu Ala Lys Cys Tyr		
50	55	60

Glu Asn Tyr Gly Leu Arg Gln Asn Ser Val Ile Ser Val Cys Ser Glu			
65	70	75	80

Asn Ser Thr Ile Phe Phe Tyr Pro Val Ile Ala Ala Leu Tyr Met Gly		
85	90	95

Val Ile Thr Ala Thr Val Asn Asp Ser Tyr Thr Glu Arg Glu Leu Leu		
100	105	110

Glu Thr Leu Asn Ile Ser Lys Pro Glu Leu Val Phe Cys Ser Lys Lys
115 120 125

19/41
Ala Ile Lys Asn Met Met Ala Leu Lys Arg Asn Val Asn Phe Ile Lys
130 135 140

Lys Val Val Leu Leu Asp Ser Lys Glu Asp Met Gly Glu Ala Gln Cys
145 150 155 160

Leu Ser Asn Phe Met Ala Arg Tyr Ser Glu Pro Asn Leu Asp Val Arg
165 170 175

Asn Phe Lys Pro Arg Asp Phe Asp Ala Lys Glu Gln Val Ala Leu Ile
180 185 190

Met Ser Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Val Leu Thr
195 200 205

His Arg Asn Leu Ser Val Arg Phe Val His Cys Lys Asp Pro Leu Phe
210 215 220

Gly Thr Arg Thr Ile Pro Ser Thr Ser Ile Leu Ser Ile Val Pro Phe
225 230 235 240

His His Ala Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Ser Tyr Phe Ile Val Gly
245 250 255

Leu Arg Val Val Leu Leu Lys Arg Phe Glu Glu Lys Phe Phe Leu Ser
260 265 270

Thr Ile Glu Lys Tyr Arg Ile Pro Thr Ile Val Leu Ala Pro Pro Val
275 280 285

Met Val Phe Leu Ala Lys Ser Pro Leu Val Asp Gln Tyr Asp Leu Ser
290 295 300

Ser Ile Arg Glu Val Ala Thr Gly Gly Ala Pro Val Gly Thr Glu Val
305 310 315 320

20 / 41

Ala Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Lys Ile Gly Gly Ile Leu Gln Gly
325 330 335

Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Cys Cys Ala Val Leu Ile Thr Pro His Asp
340 345 350

Asp Val Lys Thr Gly Ser Thr Gly Arg Val Ala Pro Tyr Val Gln Ala
355 360 365

Lys Ile Val Asp Leu Thr Thr Gly Lys Ser Leu Gly Pro Asn Lys Arg
370 375 380

Gly Glu Leu Cys Phe Lys Ser Glu Ile Ile Met Lys Gly Tyr Phe Asn
 385 390 395 400

Asn Lys Gln Ala Thr Glu Glu Ala Ile Asp Lys Glu Gly Trp Leu His
405 410 415

Ser Gly Asp Val Gly Tyr Tyr Asp Asp Asp Gly His Phe Phe Val Val
420 425 430

Asp Arg Leu Lys Glu Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val Ala Pro
435 440 445

Ala Glu Leu Glu Trp Leu Leu Leu Gln His Pro Ser Ile Lys Asp Ala
450 455 460

Gly Val Thr Gly Val Pro Asp Glu Ala Ala Ala Gly Glu Leu Pro Gly Ala
465 470 475 480

Cys Ile Val Leu Gln Glu Gly Lys Ser Leu Thr Glu Gln Glu Ile Ile
485 490 495

Asp Tyr Ile Ala Glu Arg Val Ser Pro Thr Lys Arg Ile Arg Gly Gly
500 505 510

Val Val Phe Val Asp Asp Ile Pro Lys Gly Ala Thr Gly Lys Leu Val
515 520 525

Arg Ser Glu Leu Arg Lys Leu Leu Ala Gln Lys Lys Ser Lys Leu
530 535 540

<210> 13

<211> 543

<212> PRT

<213> Wild Type Rhagophthalmus ohbai Orange Luciferase

<400> 13

Met Pro Asn Glu Ile Ile Leu His Gly Ala Lys Pro Arg Asp Pro Leu
1 5 10 15

Asp Leu Gly Thr Ala Gly Ile Gln Leu Tyr Arg Ala Leu Thr Asn Phe
20 25 30

Ser Phe Leu Arg Glu Ala Leu Ile Asp Ala His Thr Glu Glu Val Val
35 40 45

Ser Tyr Ala Asp Ile Leu Glu Asn Ser Cys Arg Leu Ala Lys Cys Tyr
50 55 60

Glu Asn Tyr Gly Leu Arg Gln Asn Ser Val Ile Ser Val Cys Ser Glu
65 70 75 80

Asn Ser Thr Ile Phe Phe Tyr Pro Val Ile Ala Ala Leu Tyr Met Gly
85 90 95

Val Ile Thr Ala Thr Val Asn Asp Ser Tyr Thr Glu Arg Glu Leu Leu
100 105 110

Glu Thr Leu Asn Ile Ser Lys Pro Glu Leu Val Phe Cys Ser Lys Lys
115 120 125

Ala Ile Lys Asn Met Met Ala Leu Lys Arg Asn Val Asn Phe Ile Lys
130 135 140

Lys Val Val Leu Leu Asp Ser Lys Glu Asp Met Gly Glu Ala Gln Cys
145 150 155 160

22/41

Leu Ser Asn Phe Met Ala Arg Tyr Ser Glu Pro Asn Leu Asp Val Arg
165 170 175

Asn Phe Lys Pro Arg Asp Phe Asp Ala Lys Glu Gln Val Ala Leu Ile
180 185 190

Met Ser Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Val Leu Thr
195 200 205

His Arg Asn Leu Ser Val Arg Phe Val His Cys Lys Asp Pro Leu Phe
210 215 220

Gly Asn Arg Thr Ile Pro Ser Thr Ser Ile Leu Ser Ile Val Pro Phe
225 230 235 240

His His Ala Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Ser Tyr Phe Ile Val Gly
245 250 255

Leu Arg Val Val Leu Leu Lys Arg Phe Glu Glu Lys Phe Phe Leu Ser
260 265 270

Thr Ile Glu Lys Tyr Arg Ile Pro Thr Ile Val Leu Ala Pro Pro Val
275 280 285

Met Val Phe Leu Ala Lys Ser Pro Leu Val Asp Gln Tyr Asp Leu Ser
290 295 300

Ser Ile Arg Glu Val Ala Thr Gly Gly Ala Pro Val Gly Thr Glu Val
305 310 315 320

Ala Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Lys Ile Gly Gly Ile Leu Gln Gly
325 330 335

Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Cys Cys Ala Val Leu Ile Thr Pro His Asp
340 345 350

Asp Val Lys Thr Gly Ser Thr Gly Arg Val Ala Pro Tyr Val Gln Ala

23/41
355 360 365

Lys Ile Val Asp Leu Thr Thr Gly Lys Ser Leu Gly Pro Asn Lys Arg
370 375 380

Gly Glu Leu Cys Phe Lys Ser Glu Ile Ile Met Lys Gly Tyr Phe Asn
385 390 395 400

Asn Lys Gln Ala Thr Glu Glu Ala Ile Asp Lys Glu Gly Trp Leu His
405 410 415

Ser Gly Asp Val Gly Tyr Tyr Asp Asp Asp Gly His Phe Phe Val Val
420 425 430

Asp Arg Leu Lys Glu Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val Ala Pro
435 440 445

Ala Glu Leu Glu Trp Leu Leu Leu Gln His Pro Ser Ile Lys Asp Ala
450 455 460

Gly Val Thr Gly Val Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro Gly Ala
465 470 475 480

Cys Ile Val Leu Gln Glu Gly Lys Ser Leu Thr Glu Gln Glu Ile Ile
485 490 495

Asp Tyr Ile Ala Glu Arg Val Ser Pro Thr Lys Arg Ile Arg Gly Gly
500 505 510

Val Val Phe Val Asp Asp Ile Pro Lys Gly Ala Thr Gly Lys Leu Val
515 520 525

Arg Ser Glu Leu Arg Lys Leu Leu Ala Gln Lys Lys Ser Lys Leu
530 535 540

<210> 14

<211> 543

<212> PRT

<213> Mutant Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase of the Invention

24 / 41

<400> 14

Met Ala Asn Glu Ile Ile Leu His Gly Ala Lys Pro Arg Asp Pro Leu
1 5 10 15

Asp Leu Gly Thr Ala Gly Ile Gln Leu Tyr Arg Ala Leu Thr Asn Phe
20 25 30

Ser Phe Leu Arg Glu Ala Leu Ile Asp Ala His Thr Glu Glu Val Val
35 40 45

Ser Tyr Ala Asp Ile Leu Glu Asn Ser Cys Arg Leu Ala Lys Cys Tyr
50 55 60

Glu Asn Tyr Gly Leu Arg Gln Asn Ser Val Ile Ser Val Cys Ser Glu
65 70 75 80

Asn Ser Thr Ile Phe Phe Tyr Pro Val Ile Ala Ala Leu Tyr Met Gly
85 90 95

Val Ile Thr Ala Thr Val Asn Asp Ser Tyr Thr Glu Arg Glu Leu Leu
100 105 110

Glu Thr Leu Asn Ile Ser Lys Pro Glu Leu Val Phe Cys Ser Lys Lys
115 120 125

Ala Ile Lys Asn Met Met Ala Leu Lys Arg Asn Val Asn Phe Ile Lys
130 135 140

Lys Val Val Leu Leu Asp Ser Lys Glu Asp Met Gly Glu Ala Gln Cys
145 150 155 160

Leu Ser Asn Phe Met Ala Arg Tyr Ser Glu Pro Asn Leu Asp Val Arg
165 170 175

Asn Phe Lys Pro Arg Asp Phe Asp Ala Lys Glu Gln Val Ala Leu Ile
180 185 190

25/41

Met Ser Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Val Leu Thr
195 200 205

His Arg Asn Leu Ser Val Arg Phe Val His Cys Lys Asp Pro Leu Phe
210 215 220

Gly Thr Arg Thr Ile Pro Ser Thr Ser Ile Leu Ser Ile Val Pro Phe
225 230 235 240

His His Ala Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Ser Tyr Phe Ile Val Gly
245 250 255

Leu Arg Val Val Leu Leu Lys Arg Phe Glu Glu Lys Phe Phe Leu Ser
260 265 270

Thr Ile Glu Lys Tyr Arg Ile Pro Thr Ile Val Leu Ala Pro Pro Val
275 280 285

Met Val Phe Leu Ala Lys Ser Pro Leu Val Asp Gln Tyr Asp Leu Ser
290 295 300

Ser Ile Arg Glu Val Ala Thr Gly Gly Ala Pro Val Gly Thr Glu Val
305 310 315 320

Ala Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Lys Ile Gly Gly Ile Leu Gln Gly
325 330 335

Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Cys Cys Ala Val Leu Ile Thr Pro His Asp
340 345 350

Asp Val Lys Thr Gly Ser Thr Gly Arg Val Ala Pro Tyr Val Gln Ala
355 360 365

Lys Ile Val Asp Leu Thr Thr Gly Lys Ser Leu Gly Pro Asn Lys Arg
370 375 380

Gly Glu Leu Cys Phe Lys Ser Glu Ile Ile Met Lys Gly Tyr Phe Asn
385 390 395 400

26/41

Asn Lys Gln Ala Thr Glu Glu Ala Ile Asp Lys Glu Gly Trp Leu His
405 410 415

Ser Gly Asp Val Gly Tyr Tyr Asp Asp Asp Gly His Phe Phe Val Val
420 425 430

Asp Arg Leu Lys Glu Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val Ala Pro
435 440 445

Ala Glu Leu Glu Trp Leu Leu Leu Gln His Pro Ser Ile Lys Asp Ala
450 455 460

Gly Val Thr Gly Val Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro Gly Ala
465 470 475 480

Cys Ile Val Leu Gln Glu Gly Lys Ser Leu Thr Glu Gln Glu Ile Ile
485 490 495

Asp Tyr Ile Ala Glu Arg Val Ser Pro Thr Lys Arg Ile Arg Gly Gly
500 505 510

Val Val Phe Val Asp Asp Ile Pro Lys Gly Ala Thr Gly Lys Leu Val
515 520 525

Arg Ser Glu Leu Arg Lys Leu Leu Ala Gln Lys Lys Ser Lys Leu
530 535 540

<210> 15

<211> 543

<212> PRT

<213> Mutant Rhagophthalmus ohbai Orange Luciferase of the Invention

<400> 15

Met Ala Asn Glu Ile Ile Leu His Gly Ala Lys Pro Arg Asp Pro Leu
1 5 10 15

Asp Leu Gly Thr Ala Gly Ile Gln Leu Tyr Arg Ala Leu Thr Asn Phe
20 25 30

27/41

Ser Phe Leu Arg Glu Ala Leu Ile Asp Ala His Thr Glu Glu Val Val
35 40 45

Ser Tyr Ala Asp Ile Leu Glu Asn Ser Cys Arg Leu Ala Lys Cys Tyr
50 55 60

Glu Asn Tyr Gly Leu Arg Gln Asn Ser Val Ile Ser Val Cys Ser Glu
65 70 75 80

Asn Ser Thr Ile Phe Phe Tyr Pro Val Ile Ala Ala Leu Tyr Met Gly
85 90 95

Val Ile Thr Ala Thr Val Asn Asp Ser Tyr Thr Glu Arg Glu Leu Leu
100 105 110

Glu Thr Leu Asn Ile Ser Lys Pro Glu Leu Val Phe Cys Ser Lys Lys
115 120 125

Ala Ile Lys Asn Met Met Ala Leu Lys Arg Asn Val Asn Phe Ile Lys
130 135 140

Lys Val Val Leu Leu Asp Ser Lys Glu Asp Met Gly Glu Ala Gln Cys
145 150 155 160

Leu Ser Asn Phe Met Ala Arg Tyr Ser Glu Pro Asn Leu Asp Val Arg
165 170 175

Asn Phe Lys Pro Arg Asp Phe Asp Ala Lys Glu Gln Val Ala Leu Ile
180 185 190

Met Ser Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Val Leu Thr
195 200 205

His Arg Asn Leu Ser Val Arg Phe Val His Cys Lys Asp Pro Leu Phe
210 215 220

Gly Asn Arg Thr Ile Pro Ser Thr Ser Ile Leu Ser Ile Val Pro Phe
225 230 235 240

28/41

His His Ala Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Ser Tyr Phe Ile Val Gly
245 250 255

Leu Arg Val Val Leu Leu Lys Arg Phe Glu Glu Lys Phe Phe Leu Ser
260 265 270

Thr Ile Glu Lys Tyr Arg Ile Pro Thr Ile Val Leu Ala Pro Pro Val
275 280 285

Met Val Phe Leu Ala Lys Ser Pro Leu Val Asp Gln Tyr Asp Leu Ser
290 295 300

Ser Ile Arg Glu Val Ala Thr Gly Gly Ala Pro Val Gly Thr Glu Val
305 310 315 320

Ala Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Lys Ile Gly Gly Ile Leu Gln Gly
325 330 335

Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Cys Cys Ala Val Leu Ile Thr Pro His Asp
340 345 350

Asp Val Lys Thr Gly Ser Thr Gly Arg Val Ala Pro Tyr Val Gln Ala
355 360 365

Lys Ile Val Asp Leu Thr Thr Gly Lys Ser Leu Gly Pro Asn Lys Arg
370 375 380

Gly Glu Leu Cys Phe Lys Ser Glu Ile Ile Met Lys Gly Tyr Phe Asn
385 390 395 400

Asn Lys Gln Ala Thr Glu Glu Ala Ile Asp Lys Glu Gly Trp Leu His
405 410 415

Ser Gly Asp Val Gly Tyr Tyr Asp Asp Asp Gly His Phe Phe Val Val
420 425 430

Asp Arg Leu Lys Glu Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val Ala Pro

29/41
435 440 445

Ala Glu Leu Glu Trp Leu Leu Leu Gln His Pro Ser Ile Lys Asp Ala
450 455 460

Gly Val Thr Gly Val Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro Gly Ala
465 470 475 480

Cys Ile Val Leu Gln Glu Gly Lys Ser Leu Thr Glu Gln Glu Ile Ile
485 490 495

Asp Tyr Ile Ala Glu Arg Val Ser Pro Thr Lys Arg Ile Arg Gly Gly
500 505 510

Val Val Phe Val Asp Asp Ile Pro Lys Gly Ala Thr Gly Lys Leu Val
515 520 525

Arg Ser Glu Leu Arg Lys Leu Leu Ala Gln Lys Lys Ser Lys Leu
530 535 540

<210> 16

<211> 1638

<212> DNA

<213> Mutant Phrixothrix Green Luciferase

<400> 16

atggaagaag agaacatcag gcacggcgag cgcctcggt acatgtcca ccctggctcc	60
---	----

gccccccacg agctgtacca gtccctgtac aagttcgctt cttccctga ggccatcatc	120
--	-----

gacgcccaca ccaacgagggt gatctctac gcccagattt tcgaaaccag ctgccgcctg	180
---	-----

gccgtgagca tcgagcagta cggctgaac gagaacaacg tggtgccgt ctgttagcgag	240
--	-----

aacaacatca acttcttcaa ccctgtgtc gcccctgt acctcgccat cccagtggcc	300
--	-----

acctccaaacg atatgtacac cgtggcgag ctgaccggcc acctgaacat ctccaagcca	360
---	-----

accatcatgt tcagctccaa gaaggccctg cccctgatcc tgagagtgcg gcagaacctg	420
---	-----

agcttcatca agaagggtggt ggtgatcgac agcatgtacg acatcaacgg cgtggagtgc	480
--	-----

gtgtctacct tcgttgcgg gtacaccgac cacacccctg accactgtc cttcacccca	540
---	-----

30 / 41

aaggacttgc	acccccgtgg	gaagatcgcc	ctgatcatgt	catcctccgg	caccacccggc	600								
ctgcctaagg	gcgtggtgct	gagccacaga	agcctgacca	tca	gatttgtt	ccacagcagg	660							
gaccatct	acggcacccg	caccgtgccc	cagaccccca	tcc	tgtccct	ggtgccattt	720							
caccacgcct	tccggatgtt	caccacccctg	tcctacttcg	tgg	ttggccct	gaagggtgg	780							
atgcgtgaaga	agt	tcgaggg	cgc	ccctttc	ctgaagacca	tccagaacta	caagatccct	840						
acaatcg	tgg	cccttcc	agt	gtgg	tgc	agagccact	ggtggatcag	900						
tacgatctgt	ccagc	cac	cgagg	tgct	ctgg	caaggatgt	960							
gccgaggctg	tgg	ccaagag	att	gaag	ctgg	catca	tccagg	1020						
gagac	ctgt	gcgt	gtat	gtat	ccac	cac	ccacggc	1080						
agacc	ccctgc	cata	catcaa	ggctaa	agg	gt	ctaccggcaa	1140						
ccaggc	gaga	gagg	cgagat	tt	gttcaag	agc	gagatga	1200						
aacc	ctgagg	ccacc	atcga	cac	catcgac	aagg	atgg	ggctgcact	1260					
ggct	actacg	acgagg	atgg	caactt	tttc	atcg	ttgg	atc	1320					
taca	agg	ggct	accagg	ttc	gttgc	act	tg	ccatca	1380					
atcg	ctgtat	ccgc	gttgac	cg	gcgt	ggcc	ctgg	ccatcg	1440					
tgt	gtcg	tgg	agg	tct	gg	caatt	acc	gatcg	1500					
gcc	cagg	tga	ccc	caactaa	gcac	ctgcgg	ggc	ggcg	gtgg	ttt	catcg	1560		
aaagg	cccta	ccgg	caag	ct	gt	atcgat	gatc	atcg	gg	at	ttt	cg	cc	1620
ccaa	agt	tcc	ag	ctgt	aa	taa	gat	gt	aa	gat	ttt	cg	cc	1638

<210> 17

<211> 75

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 17

cagcaggact acaatttat ataatcattt ataaatattc ttatattact gacggaataa 60

tcgatgcccc tacca 75

<210> 18

31/41

<211> 71

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 18

gcaggactac aattatatca atcattatat aaatactcgt atattactga cggaataatc 60

gatgccata c

71

<210> 19

<211> 77

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 19

caatgaagta atatcatatg ctcaaattt taaaacaagt tgccgcttgg cagtttgtct 60

aaaaaaatat ggcttgg

77

<210> 20

<211> 75

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 20

aatatttgaa accagctgcc gcttggcagt tagtctagag aaatatggct tggatcataa 60

caatgttgtg gcaat

75

<210> 21

<211> 77

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 21

aaaaacaaca tacactttt tggcccttta attgtgccccc tataccaagg aataccaatg 60

gcaacatcaa atgatat

77

<210> 22

<211> 73

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 22

acttttttgg ccctttaatt gctgctttat accaagggat accaatggca acatcaaatg 60

32/41

atatgtacac aga

73

<210> 23

<211> 71

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 23

catcaaatga tatgtacaca gaaagggaga tcatoggcca tttgaatata tcgaaaccat 60

gccttatgtt t

71

<210> 24

<211> 77

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 24

tttattctga aagtacaaaa acatctagat tttctcaaaa aagtcatagt cattgatagt 60

atgtacgata tcaatgg

77

<210> 25

<211> 77

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 25

atgtacgata tcaatggcgt tgaatgcgt ttttagtttg tttcacgtta tactgatcac 60

gcctttgatc cagtgaa

77

<210> 26

<211> 75

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 26

atatcaatgg cggtgaatgc gtatttagct ttgtttcacg gtatactgat cacgccttg 60

atccagtgaa attta

75

<210> 27

<211> 77

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

33/41

<400> 27
gtatttagct ttgtttcacg ttatactgat cacgcgttcg atccagtgaa atttaaccca 60
aaagagtttgc atccctt 77

<210> 28
<211> 77
<212> DNA
<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 28
tttaacccaa aagagtttga tcccttgaa agaaccgcgc taatttatgac atcatctgga 60
acaactggat tgccctaa 77

<210> 29
<211> 81
<212> DNA
<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 29
gaaccgcatt aattatgaca tcatctggaa caactggcct gcctaaaggg gtagtaataa 60
gccatagaag tataactata a 81

<210> 30
<211> 73
<212> DNA
<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 30
ctggattgcc taaagggta gtaataagcc ataggagttt aactataaga ttcgccata 60
gcagtgtatcc cat 73

<210> 31
<211> 77
<212> DNA
<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 31
aagaaatttg agggcgaatt cttctaaaa accatccaaa attacaaaat cgcttctatt 60
gtagttccctc ctccaat 77

34 / 41

<210> 32

<211> 71

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 32

aggcgaaatt cttcttaaaa accataaaaa actacaaaaat cgcttctatt gtagttcctc 60

ctccaattat g

71

<210> 33

<211> 77

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 33

gttcctcc tcattatggt atatttggct aaaagtcc tc tagtcgatga atacaattt 60

tcgagcttaa cgaaaaat

77

<210> 34

<211> 73

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 34

tttggctaaa agtccattag tcgatgaata caatctgtcg agcttaacgg aaattgctt 60

tggagggtct cct

73

<210> 35

<211> 73

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 35

ggaaattgct tggagggt ctccattagg aagagacatc gcagataaag tagcaaagag 60

attgaaagta cat

73

<210> 36

<211> 77

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 36

gggtctcc ttggaaagaga tatcgcat aaagtagcca agagattgaa agtacatgga 60

atcctacaag gataatgg 77

<210> 37
<211> 73
<212> DNA
<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 37
ggatatggat taaccgaaac ctgcagcgct ctaatactga gccccaatga tcgagaactt 60

aaaaaaggta caa 73

<210> 38
<211> 77
<212> DNA
<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 38
ccgaaacctg cagcgctcta atacttagcc ccaacgatag agaacttaaa aaaggtgcaa 60

tttggAACGCC tatGCCA 77

<210> 39
<211> 81
<212> DNA
<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 39
ctaatactta gccccaatga tcgagaactt aaaaaggta caattggAAC gccttatGCCA 60

tatgttcaag ttAAAGTTAT A 81

<210> 40
<211> 73
<212> DNA
<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 40
tggGAAGGCG CTaggACCAA GAGAAAAAGG CGAGATTGC TtCAAAAGTC AAATGCTTAT 60

gaaaggatAT cac 73

<210> 41
<211> 77
<212> DNA

36/41

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 41

aaaaggcgaa atatgcttca aaagtcaa at gcttatgaag ggctatcaca acaatccgca 60
agcaactcgt gatgctc 77

<210> 42

<211> 75

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 42

tccgcaagca actcgtgatg ctcttgacaa agatgggtgg cttcatactg gggatcttgg 60
atattacgac gaaga 75

<210> 43

<211> 73

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 43

gacagattta tctatgttgt tgatcgattt aaagagctt ttaaatataa aggatatcag 60
gttgcgcctg ctg 73

<210> 44

<211> 77

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 44

atttatctat gtagttgatc gattgaaaga actcatcaaataaaaggat atcagggtgc 60
gcctgctgaa ctggaaa 77

<210> 45

<211> 75

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 45

cgcctgctga actggaaat ctgctttac aacacccaaa tatttctgat gcgggttta 60
ttggaattcc ggacg 75

<210> 46

<211> 77

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 46

ctgaactgga aaatctgctt ttacaacatc ctaatatttc tgatgcgggt gttattggaa 60

ttccggacga atttgct

77

<210> 47

<211> 75

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 47

ttacaacatc caaatatttc tgatgcgggt gtcattggaa ttccggacga atttgctggt 60

caattaccc tt ccgcg

75

<210> 48

<211> 77

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 48

tgcgggtgtt attggaaattc cggacgaatt tgctggtcag ttaccttccg cgtgtgttgt 60

gttagagcc tt ggtaaga

77

<210> 49

<211> 73

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 49

aactaaacat cttcgaggcg gtgtcgtatt tatcgacagt attccaaaag gcccaacagg 60

aaaactcatg aga

73

<210> 50

<211> 48

<212> DNA

<213> Phrixothrix Red Luciferase

<400> 50

38 / 41

gaactccgtg caatatttgc ccgggaacag gcaaaatcaa aactataa 48

<210> 51

<211> 77

<212> DNA

<213> Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 51

cccagggacc ccctggacct gggcaccgcc ggcattcagc tctacagagc cctgaccaac 60

ttctcccttcc tgaggga

77

<210> 52

<211> 77

<212> DNA

<213> Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 52

cctgggcacc gccggcatcc agctgtacag ggccctgacc aacttctcct tcctgaggga 60

ggccctgatc gacgcc

77

<210> 53

<211> 79

<212> DNA

<213> Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 53

gtggtgtctt acgcccacat cctggagaac agctgttagac tggctaagtg ctacgagaac 60

tacggcctgc gccagaaca

79

<210> 54

<211> 79

<212> DNA

<213> Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 54

gcgccagaac agcgtgatct ccgtgtgcag cgagaatagc accatcttcct totacccgt 60

gatgcgcgccc ctgtacatg

79

<210> 55

<211> 81

<212> DNA

<213> Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 55
tcaagaaggt ggtgctgctg gacagcaagg aggatatggg cgaggccca g tgcctgagca 60
acttcatggc ccggtaactcc g 81

<210> 56
<211> 81
<212> DNA
<213> Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 56
tcaagccaag ggacttcgac gccaaaggagc aggtggccct tattatgtcc tcctctggca 60
ccaccggcct gccaaagggc g 81

<210> 57
<211> 75
<212> DNA
<213> Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 57
atcgagaagt acagaatccc aacaatcgta ctggccctc ctgtgtatggt gttcctggcc 60
aagagcccccc tggta 75

<210> 58
<211> 79
<212> DNA
<213> Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 58
atcccaacaa tcgtgtggc ccccccgtg atggtgttcc tggctaagag cccctggta 60
gaccagtacg acctgtcca 79

<210> 59
<211> 75
<212> DNA
<213> Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 59
gagaggtggc cacccggcggc gcccctgtgg gcaccgaggt tgccgtggcc gtggccaagc 60
ggctgaagat cggcg 75

40 / 41

<210> 60

<211> 75

<212> DNA

<213> Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 60

gccatcgaca aggagggctg gctgcactcc ggccgacgtgg gatactacga cgacgatggc 60

cacttcttcg tggtg

75

<210> 61

<211> 73

<212> DNA

<213> Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 61

ctccggcgac gtgggctact acgacgacga tggacatttc ttctgttgtgg accggctgaa 60

ggagctgatc aag

73

<210> 62

<211> 81

<212> DNA

<213> Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 62

cgacgatggc cacttcttcg tggtgaccg gctgaaaagag ctgatcaagt acaagggcta 60

ccaggtggcc cccgcccggc t

81

<210> 63

<211> 71

<212> DNA

<213> Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 63

agtggctgct gtcggcac ccattccatca aggtgcggc cgtgaccggc gtgccccgacg 60

aggccgcggc c

71

<210> 64

<211> 75

<212> DNA

<213> Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 64

ccgagcgagga gatcatcgac tacatcgccg agcgagtgtc tcccaccaag cgcatccgg 60

41/41

gcggcgctcg tttcg

75

<210> 65

<211> 71

<212> DNA

<213> Rhagophthalmus ohbai Green Luciferase

<400> 65

gagcgggtgt ccccaccaa ggcgcatccgg ggccggagtcg tttcggttggaa cgacatcccc 60

aaggcgcca c

71

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006362

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/85, 15/53, 9/02, 5/06, C12Q1/02, G01N33/15, 33/48,
33/483, 33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/85, 15/53, 9/02, 5/06, C12Q1/02, G01N33/15, 33/48,
33/483, 33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), CAS (STN), JICST FILE (JOIS),
SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2003/16839 A2 (XENOCORP.), 27 February, 2003 (27.02.03), Claims; pages 7 to 8, 20 to 28; Figs. 1 to 3 & US 2003/0135871 A1	1-7, 9 1-4, 7, 9, 10-14, 22, 23, 25, 26
X	US 2002/119542 A1 (Vadim R. Viviani), 29 August, 2002 (29.08.02), Abstract; Fig. 2 (Family: none)	5
Y	VIVIANI V.R. et al., "Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures", Biochemistry, 1999, Vol.38, No.26, pages 8271 to 8279	1-4, 7, 9, 10-14, 22, 23, 25, 26

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 August, 2004 (09.08.04)

Date of mailing of the international search report
24 August, 2004 (24.08.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/006362

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Katsuhiro OMIYA et al., "Comparative aspects of a luciferase molecule from the Japanese luminous beetle, <i>Rhagophthalmus ohbai</i> ", Yokosuka-shi Hakukenho (Shizen) Sci.Rept. Yokosuka City Mus., 2000, No.47, pages 31 to 38	1-4, 7, 9, 10-14, 22, 23, 25, 26
Y	VIVIANI V. et al., "Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases.", Biochem Biophys Res Commun., 2001, Vol.280, No.5, pages 1286 to 1291	1-4, 7, 9, 10-14, 22, 23, 25, 26
Y	SUMIYA M. et al., "Cloning and expression of a luciferase from the Japanese luminous beetle <i>Rhagophthalmus ohbai</i> .", Biolumin. Chemilumin., Proc.Int.Symp., 1999, pages 433 to 436	1-4, 7, 9, 10-14, 22, 23, 25, 26
Y	JP 2002-542791 A (K.R. Leuven Research & Development), 17 December, 2002 (17.12.02), Claims: Par. Nos. [0019], [0034] & WO 2000/065076 A2 & EP 1183381 A2	10
Y	GRENTZMANN G. et al., "A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals.", RNA, 1998, Vol.4, No.4, pages 479 to 486	11-14, 22, 23, 25, 26
A	WO 97/24490 A1 (Tropix, Inc.), 10 July, 1997 (10.07.97), & US 66032657 B1 & EP 874913 A1 & JP 2000-513563 A	8, 11-27
P,X	Katsuhiro OMIYA, "Hakko Kochu no Seibutsu Hakko Kiko no Kiso to Oyo -Seibutsu Hakko ni yotte Saibo Joho o Saguru-", Seikagaku, The Japanese Biochemical Society Tokyo, 25 January, 2004 (25.01.04), Vol.76, No.1, pages 5 to 15	1-27
P,A	NIEUWENHUIJSEN BW, "A dual luciferase multiplexed high-throughput screening platform for protein-protein interactions.", J.Biomol.Screen., 2003 December, Vol.8, No.6, pages 676-684	8, 11-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2004/006362**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The matter common to claims 1-27 is "a photoprotein capable of emitting light whose emission wavelength is substantially not dependent upon determination conditions". However, search has revealed that this common matter is not novel because the reference (WO 2003/16839 A2 (XENOCORPORATION) 2003.02.27) discloses red photoprotein derived from railroad worm, having realized stable expression in mammiferous cells (the photoprotein comprehended in the "photoproteins capable of emitting light whose emission wavelength is substantially not dependent upon determination conditions").

Consequently, this common matter falls within the category of prior art and (continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006362

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

hence cannot be "special technical features".

Therefore, the inventions claimed in claims 1-27 are to be classified into four invention groups, namely, the group whose special technical feature resides in "green photoprotein derived from railroad worm, having realized stable expression in mammiferous cells", the group whose special technical feature resides in "green photoprotein derived from Rhagophthalmus ohbai, having realized stable expression in mammiferous cells", the group whose special technical feature resides in "luteofulvous photoprotein derived from Rhagophthalmus ohbai, having realized stable expression in mammiferous cells" and the group whose special technical feature resides in "attaining stable expression of two or more photoprotein genes in mammiferous cells".

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N15/85, 15/53, 9/02, 5/06, C12Q1/02, G01N33/15, 33/48, 33/483, 33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N15/85, 15/53, 9/02, 5/06, C12Q1/02, G01N33/15, 33/48, 33/483, 33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE(STN) BIOSIS(STN) WPIDS(STN) CAS(STN) JICSTファイル(JOIS)

SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2003/16839 A2(XENOCORPORATION) 2003.02.27, Claims	1-7, 9
Y	, p. 7-8, 20-28, Fig. 1-3 & US 2003/0135871 A1	1-4, 7, 9, 10-1 4, 22, 23, 25, 26
X	US 2002/119542 A1(Vadim R. Viviani) 2002.08.29, Abstract, Fig. 2 (ファミリーなし)	5
Y	VIVIANI VR et.al., "Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures" Biochemistry, 1999, Vol. 38, No. 26, p. 8271-9	1-4, 7, 9, 10-1 4, 22, 23, 25, 2 6

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 08. 2004

国際調査報告の発送日

24. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

田中 晴絵

4 N 9739

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C(続き) .	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	近江谷克裕他, "Comparative aspects of a luciferase molecule from the Japanese luminous beetle, Rhagophthalmus ohbai" ,横須賀市博研報(自然) Sci.Rept.Yokosuka City Mus., 2000, No. 47, p. 31-38	1-4, 7, 9, 10-1 4, 22, 23, 25, 2 6
Y	VIVIANI V. et al., "Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases." Biochem Biophys Res Commun., 2001, Vol. 280, No. 5, p. 1286-91.	1-4, 7, 9, 10-1 4, 22, 23, 25, 2 6
Y	SUMIYA M. et al., "Cloning and expression of a luciferase from the Japanese luminous beetle Rhagophthalmus ohbai." Biolumin. Chemilumin., Proc. Int. Symp., 1999, p. 433-436	1-4, 7, 9, 10-1 4, 22, 23, 25, 2 6
Y	JP 2002-542791 A(K. R. Leuven Research & Development) 2002. 12. 17, 特許請求の範囲, [0019], [0034] & WO 2000/065076 A2 & EP 1183381 A2	10
Y	GRENTZMANN G. et. al., "A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals." RNA, 1998, Vol. 4, No. 4, p. 479-86.	11-14, 22, 23, 25, 26
A	WO 97/24490 A1(Tropix, Inc.,) 1997. 07. 10 & US 66032657 B1 & EP 874913 A1 & JP 2000-513563 A	8, 11-27
P X	近江谷克裕, 発光甲虫の生物発光機構の基礎と応用—生物発光によって細胞情報を探る—, 生化学, 日本生化学会東京, 2004. 01. 25, Vol. 76, No. 1, p. 5-15	1-27
P A	NIEUWENHUIJSEN BW, "A dual luciferase multiplexed high-throughput screening platform for protein-protein interactions." J Biomol Screen., 2003 Dec, Vol. 8, No. 6, p. 676-84	8, 11-27

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-27に共通の事項は、「発光波長が測定条件に実質的に依存しない光を発光する発光蛋白」であるが、調査の結果、文献(WO 2003/16839 A2(XENOMON CORPORATION) 2003.02.27)には、哺乳類細胞安定発現化された鉄道虫由来赤色発光タンパク（「発光波長が測定条件に実質的に依存しない光を発光する発光蛋白」に包含されるものである。）が開示されているから、上記共通の事項は新規でないことが明らかとなった。

結果として、上記共通の事項は、先行技術の域をでないから特別な技術的特徴とは言えない。

それ故、請求の範囲1-27に記載された発明は、「哺乳類細胞安定発現化された鉄道虫由来緑色発光蛋白」に特別な技術的特徴を有するものと、「哺乳類細胞安定発現化されたイリオモテボタル由来緑色発光蛋白」に特別な技術的特徴を有するものと、「哺乳類細胞安定発現化されたイリオモテボタル由来橙色発光蛋白」に特別な技術的特徴を有するものと、「2以上の発光タンパク遺伝子を哺乳類細胞で安定発現すること」に特別な技術的特徴を有するものの4の発明群に分類される。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。